

CHARAKTERISIERUNG DER tRNA-
BINDUNGSSTELLEN VON RIBOSOMEN AUS
ESCHERICHIA COLI

ROLAND LILL

1986

*Diss
München*

**Charakterisierung der tRNA-Bindungsstellen von
Ribosomen aus Escherichia coli**

Dissertation
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Roland Lill
aus Öhringen

München 1986

vorgelegt am 28.1.1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Wintermeyer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.3.1986

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit vom September 1981 bis Juli 1985 unter der Anleitung von Prof. Dr. W. Wintermeyer durchgeführt.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

Lill, R., Robertson, J.M., & Wintermeyer, W. (1984) *Biochemistry* 23, 6710 - 6717

Robertson, J.M., Lill, R., & Wintermeyer, W. (1984) in *Metabolism and Enzymology of Nucleic Acids Including Gene Manipulations 5* (Zelinka, J., & Balan, J., Hrsg.) S. 307 - 319, Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava

Wintermeyer, W., Lill, R., Paulsen, H., & Robertson, J.M. (1985) in *Mechanisms of Protein Synthesis* (Bermek, E., Hrsg.), S. 76 - 89, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

Wintermeyer, W., Lill, R., Paulsen, H., & Robertson, J.M. (1986) in *Structure, Function, and Genetics of Ribosomes* (Hardesty, B., Hrsg.), Springer, New York, im Druck

Lill, R., Robertson, J.M., & Wintermeyer, W. (1986) *Biochemistry*, im Druck

Herrn Prof. Dr. W. Wintermeyer danke ich sehr herzlich für Anregungen, Ratschläge, Kritik und Diskussionen. Meinen Kollegen, insbesondere Dr. H. Paulsen und Dr. J.M. Robertson, bin ich dankbar für die gute Zusammenarbeit, die Überlassung von Material und für hilfreiche Diskussionen.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG.....	1
2.	ERGEBNISSE.....	10
2.1.	Stöchiometrien der tRNA-Bindung in die verschiedenen ribosomalen tRNA-Bindungsstellen.....	10
2.1.1.	Bestimmung der tRNA-Bindungsaktivität der P- und A-Stelle durch den Indikatorbindungstest.....	11
2.1.2.	Ribosomen binden zwei Moleküle N-AcPhe-tRNA ^{Phe}	14
2.1.3.	Eine zusätzliche, dritte Bindungsstelle für deacylierte tRNA ^{Phe}	19
2.1.4.	tRNA-Bindung in Abwesenheit von mRNA.....	23
2.2.	Methodische Vorbereitung der Gleichgewichtstitrationen	25
2.2.1.	Geschwindigkeit der tRNA-Bindung in die P-, A- und E-Stelle.....	25
2.2.2.	Stabilität der tRNA-Bindung in die P-, A- und E-Stelle	29
2.2.3.	Reaktionen mit Puromycin.....	33
2.3.	Affinitäten der ribosomalen tRNA-Bindungsstellen.....	38
2.3.1.	Bindung von deacylierter tRNA ^{Phe} in die E-Stelle.....	39
2.3.2.	Bindung von deacylierter tRNA ^{Phe} und N-AcPhe-tRNA ^{Phe} in die A-Stelle.....	43
2.3.3.	Nicht-enzymatische und enzymatische Bindung von Phe- tRNA ^{Phe} in die A-Stelle.....	49
2.3.4.	Bindung von deacylierter tRNA ^{Phe} und N-AcPhe-tRNA ^{Phe} in die P-Stelle.....	52
2.3.5.	Zahl der ionischen Wechselwirkungen bei der tRNA- Bindung in die P-Stelle.....	55
2.3.6.	Affinitäten der tRNA-Bindung in Abwesenheit von mRNA...	57

2.4.	Bindung falsch-kodierter tRNAs in die E-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen.....	64
2.4.1.	Indirekter Nachweis der Besetzung der E-Stelle durch den Indikatorbindungstest der A-Stelle.....	65
2.4.2.	Inhibierung der Bindung von tRNA ^{Phe} _{Prf16/20} in die E-Stelle.....	68
2.4.3.	Die Affinität korreliert mit dem Grad der Homologie zum Anticodonstamm der tRNA ^{Phe} aus E. coli.....	75
2.4.4.	Das 3'-terminale Adenosin einer tRNA ist entscheidend für eine effiziente Bindung in die E-Stelle.....	77
3.	DISKUSSION.....	80
3.1.	Die ribosomalen tRNA-Bindungsstellen und ihre Affinitäten.....	80
3.2.	Funktionelle Bedeutung der E-Stelle für den Elongationszyklus der Proteinbiosynthese.....	84
3.3.	Kontaktstellen des tRNA-Moleküls bei der Bindung an Ribosomen.....	91
4.	THEORETISCHER TEIL.....	94
4.1.	Auswertung der Titrationskurven.....	94
4.1.1.	Bindungsmodell für die ribosomalen tRNA-Bindungs- stellen.....	95
4.1.2.	Durchführung der Gleichgewichtstitrationen.....	98
4.1.3.	Modell für eine Bindungsstelle.....	100
4.1.4.	Modell für die sequentielle Besetzung zweier Bindungsstellen.....	102
4.1.5.	Modell für die sequentielle Besetzung dreier Bindungsstellen.....	104
4.1.6.	Bestimmung stöchiometrischer Bindungskonstanten.....	105
4.2.	Auswertung des Indikatorbindungstests.....	107
4.2.1.	Indikatorbindungstest der P-Stelle.....	107
4.2.2.	Indikatorbindungstest der A-Stelle.....	110
4.2.3.	Der Indikatorbindungstest zur Bestimmung der Bindungskonstanten der A-Stelle.....	113

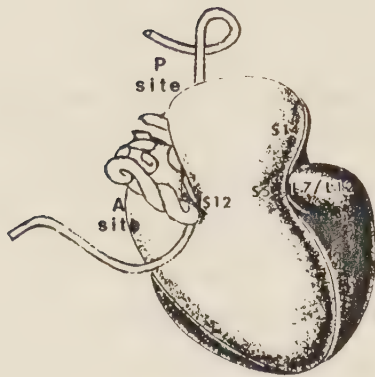
4.3.	Bestimmung der Affinitäten der Bindung falsch-kodierter tRNAs in die ribosomale E-Stelle.....	114
5.	MATERIALIEN UND METHODEN.....	116
5.1.	Materialien.....	116
5.1.1.	Ribosomen.....	116
5.1.2.	Nicht-aminoacylierte tRNAs.....	116
5.1.3.	Aminoacylierte tRNA ^{Phe}	117
5.1.4.	Proflavin-markierte tRNA ^{Phe}	117
5.1.5.	Präparation von (³² P)-markierter tRNA ^{Phe}	118
5.1.6.	Ternärer Komplex Phe-tRNA ^{Phe} ·EF-Tu·GTP.....	119
5.1.7.	Enzyme.....	119
5.1.8.	Sonstige Reagentien.....	120
5.2.	Methoden.....	121
5.2.1.	Herstellung der tRNA-Ribosomen-Komplexe.....	121
5.2.2.	Titrationverfahren.....	122
5.2.3.	Analyse der tRNA-Ribosomen-Komplexe.....	123
5.2.4.	Apparative Hilfsmittel.....	125
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	126
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	130
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	137

Lebenslauf

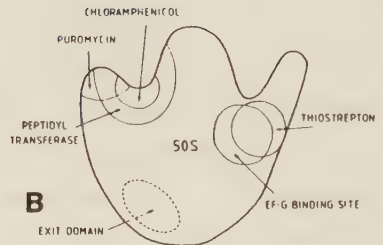
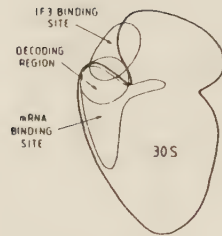
1. EINLEITUNG

In der Proteinbiosynthese wird die in der Basensequenz der mRNA verschlüsselte genetische Information an den Ribosomen in Protein übersetzt. Bei diesem zentralen biochemischen Prozeß der Zelle treten verschiedene tRNAs, mRNA und mehrere Proteinfaktoren in spezifische Wechselwirkung mit Ribosomen. Am besten studiert ist das Proteinsynthesystem aus dem Eubakterium *Escherichia coli*. Das Ribosom aus *E. coli* ist ein Zellpartikel von ca. 25 nm Durchmesser, einem Molekulargewicht von 2.5 Mdal und einem Sedimentationskoeffizienten von 70S. Es läßt sich dissoziieren in eine kleinere (30S) und eine größere (50S) Untereinheit, die ein bzw. zwei Moleküle ribosomale RNA und 21 bzw. 32 Proteine enthalten; ungefähr zwei Drittel der Masse des Ribosoms besteht aus RNA (Wittmann, 1982; 1983). Eukaryontische Ribosomen sind etwas größer (80S), jedoch im Aufbau sehr ähnlich (Wool, 1979).

Mit Hilfe physikalischer Methoden wie der Immunelektronenmikroskopie (Stöffler & Stöffler-Meilicke, 1984; Lake, 1985) und der Neutronenbeugung (Moore, 1980) sowie durch chemische und photochemische Quervernetzung (Traut et al., 1980; Ofengand, 1980) konnte die räumliche Struktur der beiden Untereinheiten und die Lokalisierung einzelner ribosomaler Proteine und RNAs in allerdings geringer Auflösung (2-5 nm) bestimmt werden (Abb. 1). Hochauflösende Röntgenstrukturdaten konnten wegen der äußerst schwierigen Kristallisation solch großer und instabiler Partikel bisher nicht erhalten werden (Wittmann et al., 1982; Yonath et al., 1984). Auch die funktionellen Stellen wie die Bindungsorte für tRNA und Elongationsfaktoren konnten mit den erwähnten Metho-



A



B

Abb. 1: Dreidimensionale Struktur des Ribosoms aus *E. coli* und Lokalisierung funktioneller Stellen.

A) Die räumliche Struktur und die Lage einzelner Proteine der kleinen (30S; oben) und großen (50S; unten) Untereinheit ist allgemein akzeptiert (Prince et al., 1983); für die Orientierung der tRNAs in der P- und A-Stelle existieren allerdings auch andere Vorschläge (s. Lake, 1985; aus Lake, 1979). Die Abbildung verdeutlicht das Größenverhältnis zwischen tRNA und Ribosomen. Zur genaueren Struktur des tRNA-Moleküls siehe Abb. 2.

B) Die Lokalisierung funktionell wichtiger Stellen wurde mit verschiedenen Techniken bestimmt (s. Text; aus Wittmann, 1983).

den, jedenfalls grob, lokalisiert werden (Abb. 1). Der Kontakt mit den beiden funktionell wichtigsten Domänen der tRNA, dem Anticodon und dem Akzeptorende, findet auf unterschiedlichen Untereinheiten statt: Die Ablesung der mRNA durch das Anticodon der tRNA geschieht in der Spalte der kleinen Untereinheit; das Peptidyltransferasezentrum hingegen wurde auf der großen Untereinheit nahe der zentralen Protuberanz lokalisiert.

Die Funktion des Ribosoms ist eingehend mit biochemischen Methoden untersucht worden. Die Reihenfolge der einzelnen Teilschritte und die Rolle der dabei beteiligten Komponenten ist bekannt (Weissbach & Pestka, 1977; Chambliss et al., 1980). Von einem Verständnis der Vorgänge auf molekularer Ebene ist man allerdings noch weit entfernt (Cantor, 1979). Zwar wurden einige detaillierte mechanistische Vorschläge gemacht (z.B. Spirin, 1969; Woese, 1970; Leder, 1973; Lake, 1977), jedoch fehlen bisher weitgehend die strukturellen, thermodynamischen und kinetischen Daten, die zur kritischen Überprüfung der vorgeschlagenen Modelle notwendig sind.

Wesentlich für das Verständnis der Proteinbiosynthese ist die genaue Kenntnis der Wechselwirkung zwischen tRNA und ihren ribosomalen Bindungsstellen. In den verschiedenen Phasen des Elongationszyklus' muß die Wechselwirkung zwischen tRNA und Ribosomen sehr unterschiedlichen Anforderungen genügen. Der Zyklus beginnt mit der Codon-spezifischen Bindung einer Aminoacyl-tRNA in die ribosomale Akzeptor- oder A-Stelle; die Reaktion wird durch einen Elongationsfaktor (EF-Tu in *E. coli*) katalysiert und verläuft unter Hydrolyse eines Moleküls GTP. Im folgenden Schritt wird der Peptidylrest einer in der Donor- oder P-Stelle gebundenen Peptidyl-tRNA auf die Aminoacylgruppe der in der A-Stelle gebundenen Aminoacyl-tRNA übertragen. Im Translokationsschritt schließlich dissoziiert deacylierte tRNA unter Beteiligung eines weiteren Elongationsfaktors (EF-G in *E. coli*) aus der P-Stelle, Peptidyl-tRNA wird zusammen mit der mRNA von der A- in die P-Stelle verschoben und ein weiteres Molekül GTP wird hydrolysiert. Um eine Verschiebung des Leserasters zu vermeiden, muß während dieser Reaktionsfolge die Bindung der Peptidyl-tRNA zum entspre-

chenden Codon einerseits sehr stabil sein; andererseits darf die Bindung nicht zu fest sein, da sonst während der nächsten Elongationsrunde die Dissoziation der entladenen tRNA vom Ribosom zu langsam erfolgt (Eigen, 1971).

Als mögliche Funktion des während der Translokation verbrauchten Moleküls GTP diskutierte Lipmann (1969), daß die freiwerdende Energie in Analogie zur Muskelkontraktion für die Bewegung des tRNA/mRNA-Komplexes während der Translokation benötigt wird. Gegen ein solches Modell sprechen jedoch einige neuere experimentelle Befunde. Auch in Abwesenheit von Elongationsfaktoren und GTP wurde eine Proteinsynthese an Ribosomen beobachtet, falls als Substrate Aminoacyl-tRNAs zur Verfügung stehen (Gavrilova et al., 1976; Spirin, 1978). Zur Knüpfung der Peptidbindung unter Katalyse des Peptidyltransferasezentrums am Ribosom ist die relativ hohe freie Energie der Hydrolyse der Esterbindung einer Aminoacyl-tRNA bei weitem ausreichend, um die Reaktion spontan zu ermöglichen. Die Existenz der faktorfreien Proteinsynthese impliziert natürlich, daß während der Translokation auch die Bewegung der tRNAs und die Dissoziation der deacylierten tRNA von Ribosom spontan ohne weitere Energiezufuhr erfolgen kann. Diese Schlußfolgerung konnte experimentell zum einen dadurch gestützt werden, daß die Enzym-katalysierte Translokation auch in Gegenwart von nicht-hydrolysierbaren GTP-Analoga abläuft (Inoue-Yokosawa et al., 1974; Modolell et al., 1975). Zum anderen wurde festgestellt, daß die GTP-Hydrolyse erst nach der Verschiebung des tRNA/mRNA-Komplexes erfolgt (Robertson et al., 1986).

Die erwähnten Befunde zeigen, daß jeder einzelne Teilschritt des Elongationszyklus' ohne weitere Energiequelle thermodynamisch möglich ist. Die thermodynamische und kinetische Charakterisie-

rung der verschiedenen Zwischenzustände sollte daher zu einem besseren Verständnis der Vorgänge beitragen. Von besonderer Bedeutung hierfür sind die Affinitäten zwischen tRNA und ihren ribosomalen Bindungsstellen. Die Kenntnis solcher Parameter sollte Rückschlüsse ermöglichen auf mechanistische Details der verschiedenen Reaktionsschritte, z.B. Fragen beantworten, worin die Triebkraft der spontanen Translokation liegt oder woher die Energie zur Entfernung deacylierter tRNA vom Ribosom stammt.

Gleichgewichtsmessungen zur Wechselwirkung von tRNA mit ihren Bindungsstellen an Ribosomen aus *E. coli* sind von einigen Arbeitsgruppen durchgeführt worden. Die bisher publizierten Bindungskonstanten ergeben allerdings kein konsistentes Bild, sondern weichen z.T. stark (100fach) voneinander ab. So wurden z.B. für die P-Stelle Affinitäten für die Bindung von N-AcPhe-tRNA^{Phe}, einem Peptidyl-tRNA-Analogen, zwischen $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Kirillov & Semenov, 1982) und $4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (Rheinberger et al., 1981; Schmitt et al., 1982) berichtet. Die entsprechenden Daten für die A-Stelle variieren von $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Kirillov & Semenov, 1982) über $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (Rheinberger et al., 1981) bis zu $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (Schmitt et al., 1982). Auch für die Bindung von deacylierter tRNA^{Phe} wurden sehr unterschiedliche Ergebnisse erhalten (Fairclough et al., 1979; Peters & Yarus, 1979; Rheinberger et al., 1981; Kirillov et al., 1983).

Die beträchtlichen Variationen der Daten sind zumindest teilweise auf Unterschiede in der Ribosomenqualität, auf die Verwendung von Nicht-Gleichgewichtsmethoden bei der quantitativen Analyse der Komplexbildung und auf zum Teil ungenügende Auswertungsprozeduren (s.u.) zurückzuführen. Ein weiterer wesentlicher Punkt ist, daß - zumindest bei früheren Arbeiten (Fairclough et

al., 1979; Peters & Yarus, 1979) - die Existenz einer zusätzlichen, dritten Bindungsstelle für deacylierte tRNA (s.u.) nicht berücksichtigt wurde. Jedoch auch neuere Ergebnisse, die diese Bindungsstelle in die Datenauswertung einbeziehen, weichen erheblich voneinander ab (Rheinberger et al., 1981; Kirillov et al., 1983).

Das allgemein akzeptierte Modell der Proteinbiosynthese beruht auf der Existenz zweier tRNA-Bindungsstellen am Ribosom, der P- und der A-Stelle. In der Vergangenheit wurde mehrfach vermutet, daß neben den genannten noch weitere Bindungsstellen funktionell beteiligt sind. So wurden von Hardesty et al. (1969) und Lake (1977) Bindungsstellen vorgeschlagen, denen eine Funktion beim Eintritt der Aminoacyl-tRNA ins Ribosom bzw. bei der spezifischen Codonerkennung zukommen soll. Da allerdings zumindest der Anticodonbereich der tRNA in diesen Bindungsstellen und der A-Stelle im selben Bereich des Ribosoms gebunden ist, handelt es sich hierbei nicht um zusätzliche, sondern um überlappende Bindungsstellen. Die Existenz einer zusätzlichen, dritten tRNA-Bindungsstelle wurde von Wettstein & Noll (1965) für eukaryontische Ribosomen beschrieben. Da diese Bindungsstelle spezifisch deacylierte tRNA bindet, wurde von Noll (1966) vorgeschlagen, daß ihr eine Bedeutung bei der Dissoziation der entladenen tRNA vom Ribosom zukommt. Diese wie auch einige andere Arbeiten (Swan et al., 1969; Leder et al., 1969) wurden jedoch in der Folge nicht weiter bestätigt (Roufa et al., 1970), so daß sich das Modell mit zwei tRNA-Bindungsstellen am Ribosom durchsetzte (Watson, 1964; Leder, 1973).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde auf Ribosomen aus *E. coli* eine dritte tRNA-Bindungsstelle mit ähnlicher Funktion wie die von Noll (1966) vorgeschlagene beobachtet, die spezifisch mit deacylierter tRNA besetzt wird (Rheinberger et al., 1981). Die Ergebnisse waren allerdings umstritten (Prince & Garrett, 1982) und konnten kurze Zeit später experimentell nicht bestätigt werden (Schmitt et al., 1981; 1982). Nach den Berichten zweier anderer Arbeitsgruppen (Grajevskaja et al., 1982; Kirillov et al., 1983) und den hier vorgelegten Resultaten kann die sog. E-Stelle (Noll, 1966) jedoch als gesichert gelten.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, Gleichgewichtskonstanten für die Wechselwirkung von tRNA mit ihren ribosomalen Bindungsstellen zu bestimmen, um zu einem thermodynamischen Verständnis der einzelnen Teilschritte des Elongationszyklus' zu kommen. Hierzu war es zunächst notwendig, die genaue Anzahl der Bindungsstellen auf Ribosomen aus *E. coli* für beladene und unbeladene tRNA zu ermitteln und die Eigenschaften der tRNA-Bindung in die verschiedenen Bindungsstellen biochemisch zu charakterisieren.

Für die Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten stellt die Anwesenheit mehrerer tRNA-Bindungsstellen am Ribosom ein oft unterschätztes Problem dar (s. Klotz, 1983). Ohne eine stellenspezifische Analyse der gebundenen tRNA ist es zunächst nur möglich, die sog. stöchiometrischen Bindungskonstanten (Klotz, 1974) zu bestimmen, die angeben, mit welcher Affinität die erste, zweite und dritte tRNA am Ribosom gebunden wird, wobei eine Zuordnung zu den einzelnen Bindungsstellen nicht möglich ist. Natürlich sind stellenspezifische Bindungskonstanten (Klotz, 1974), d.h. die Affinitäten, mit der eine tRNA in eine bestimmte

Bindungsstelle gebunden wird, wesentlich nützlicher (Ackers et al., 1983). In der vorliegenden Arbeit sollte daher aufgrund der qualitativen Charakterisierung des Bindungsverhaltens der verschiedenen ribosomalen tRNA-Bindungsstellen ein Modell entwickelt werden, das die Bestimmung der stellenspezifischen Bindungskonstanten aus Gleichgewichtstitrationen erlaubt.

Eine kritische Größe bei quantitativen Untersuchungen von Komplexen ist die Kenntnis der aktiven Konzentration der beteiligten Biomoleküle. Insbesondere gilt dies für so komplexe Partikel wie Ribosomen, die während der Isolierung z.B. eines ihrer Proteine verlieren und dadurch in einer oder mehreren Teilfunktionen beeinträchtigt sein können. So findet man in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben über die Aktivität der verwendeten Ribosomenpräparation (5-100%), welche üblicherweise aus Plateaus von Sättigungstitrationen abgeschätzt wurde. Bisher wurde keine Methode zur Bestimmung der Ribosomenaktivität beschrieben, die ein solches Vorgehen, das ja die Kenntnis der Zahl der Bindungsstellen voraussetzt, vermeidet. In dieser Arbeit sollte daher ein Test zur zweifelsfreien Bestimmung der tRNA-Bindungsaktivität der einzelnen tRNA-Bindungsstellen entwickelt werden.

Die experimentelle Technik zur Bestimmung der Menge an gebundener tRNA ist zumindest bei Vorliegen rasch dissoziierender Komplexe von entscheidender Bedeutung. Um auch sehr labile Komplexe erfassen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit mehrere Techniken verwendet. Neben der Nitrocellulosefiltration mit radioaktiv-markierten tRNAs wurden vor allem Fluoreszenzmessungen durchgeführt, wobei als Meßgröße die Fluoreszenzänderung bei Bindung fluoreszierender tRNA-Moleküle (Abb. 2) in die verschiedenen ribosomalen Bindungsstellen benutzt wurde. Als

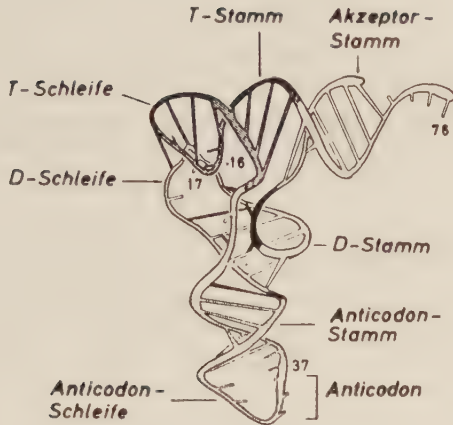


Abb. 2: Dreidimensionale Struktur der tRNA^{Phe} aus Hefe.

Die Positionen der in dieser Arbeit benutzten Fluorophore Wybutin und Proflavin in der Anticodon- und D-Schleife und die Position des 3'-terminalen Adenosins sind besonders gekennzeichnet (nach Kim et al., 1974).

Fluorophore dienten die natürliche Base Wybutin in der Anticodon-schleife der tRNA^{Phe} aus Hefe sowie der auf chemischem Wege eingebaute Farbstoff Proflavin in der Dihydrouridinschleife der tRNA^{Phe}s aus E. coli und Hefe (Wintermeyer & Zachau, 1979). Zur Untersuchung der Bindung in die A-Stelle konnte als dritte Methode auch ein in dieser Arbeit entwickelter Indikatorbindungs-test eingesetzt werden.

Wesentlich für das mechanistische Verständnis der einzelnen Schritte des Elongationszyklus' ist der Beitrag der Codon-Anti-codon-Wechselwirkung zur Bindungsstärke in den verschiedenen tRNA-Bindungsstellen. Es sollten deshalb auch in Abwesenheit von mRNA ihre Eigenschaften untersucht und die Affinitäten der Codon-unabhängigen tRNA-Bindung ermittelt werden.

2. ERGEBNISSE

2.1. Stöchiometrien der tRNA-Bindung in die verschiedenen ribosomalen tRNA-Bindungsstellen

In der "Einleitung" wurde bereits erwähnt, daß zu Beginn dieser Arbeit Unklarheit über die Zahl der tRNA-Bindungsstellen auf Ribosomen aus *E. coli* bestand. In diesem Kapitel soll deshalb für deacylierte tRNA^{Phe} und N-AcPhe-tRNA^{Phe} (als Peptidyl-tRNA-Analogon) bestimmt werden, wieviele Kopien jeweils auf dem Ribosom gebunden werden. Üblicherweise werden zur Klärung solcher Fragen Sättigungstitrationen durchgeführt, die allerdings die Kenntnis der tRNA-Bindungsaktivität der verwendeten Ribosomenpräparation voraussetzt. Da in der Literatur bisher keine Methode zur Bestimmung der Ribosomenaktivität beschrieben ist, wurde hierfür zunächst ein Analyseverfahren entwickelt, der Indikatorbindungstest. Durch die Ausnutzung der stellenspezifischen Bindung sog. Indikator-tRNAs war es möglich, die Aktivität der P- und A-Stelle getrennt voneinander zu ermitteln. Mit den Ergebnissen dieses Tests wird dann in Sättigungstitrationen die Zahl der ribosomalen Bindungsstellen für die beiden tRNA-Arten bestimmt. Schließlich werden die Untersuchungen zur Zahl der Bindungsstellen ausgedehnt auf Ribosomen, die nicht mit mRNA programmiert sind.

2.1.1. Bestimmung der tRNA-Bindungsaktivität der P- und A-Stelle durch den Indikatorbindungstest

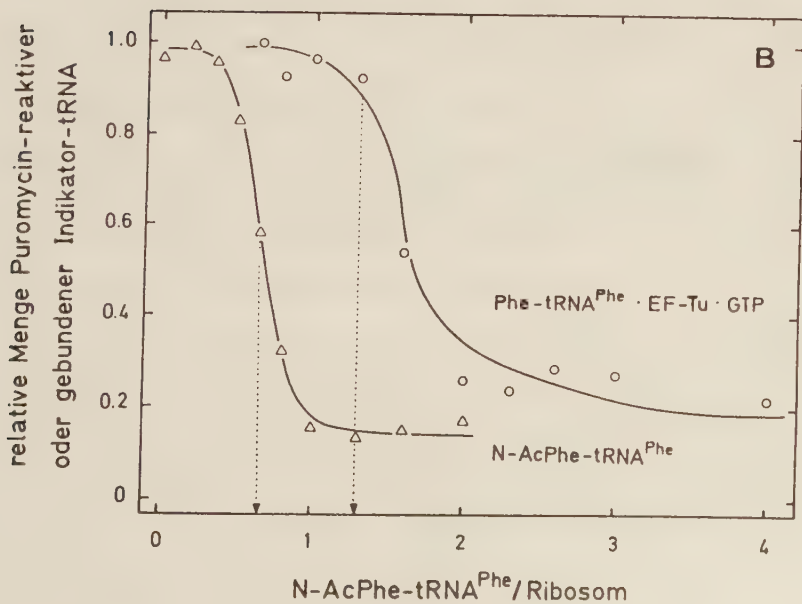
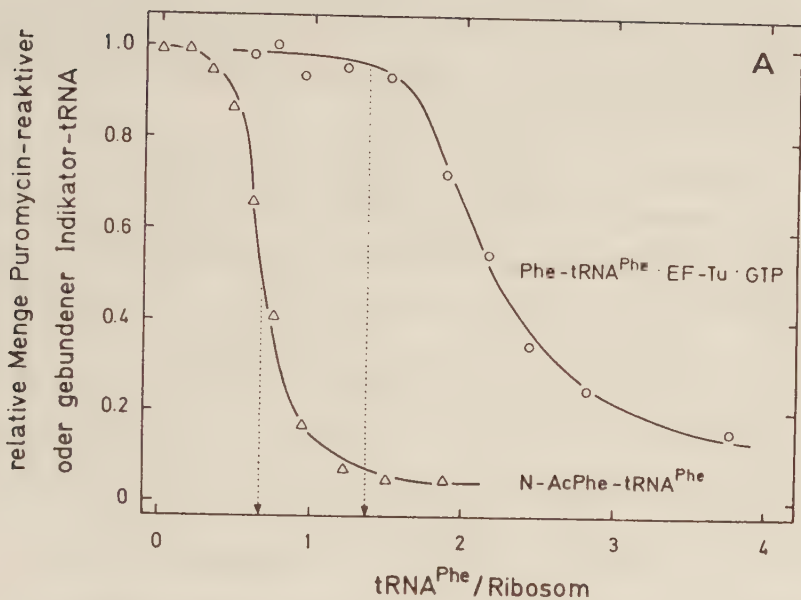
Der zur Bestimmung der tRNA-Bindungsaktivität der Ribosomen entwickelte Indikatorbindungstest basiert auf der stellenspezifischen Bindung sog. Indikator-tRNAs: Für die P-Stelle wurde die Puromycinreaktivität von N-AcPhe-tRNA^{Phe} (s. 2.2.3.) als Indikator verwendet; für die A-Stelle wurde die Tatsache ausgenutzt, daß Phe-tRNA^{Phe} unter der Katalyse von EF-Tu·GTP ausschließlich in diese Bindungsstelle gebunden wird. Der Test wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurden Poly(U)-programmierte Ribosomen mit steigenden Mengen der zu untersuchenden tRNA versetzt; die Ribosomenkonzentration wurde sehr viel höher als die Dissoziationskonstanten der beiden Bindungsstellen gewählt, um eine nahezu stöchiometrische Aufnahme der tRNA zu gewährleisten. Nach der Äquilibrierung wurde eine konstante Menge Indikator-tRNA zugegeben und ihr Bindungsvermögen in die P- bzw. A-Stelle verfolgt. Aus dem sinkenden Anteil ihrer Bindung läßt sich die zunehmende Besetzung der jeweiligen Bindungsstelle mit zuerst zugegebener tRNA indirekt ablesen.

Abb. 3 zeigt solche Experimente mit deacylierter tRNA^{Phe} und N-AcPhe-tRNA^{Phe} bei 20 mM Mg²⁺. Wie aus dem steilen Abfall der Puromycinreaktivität ersichtlich ist, wird mit beiden tRNA-Arten zunächst die P-Stelle mit tRNA gefüllt. Erst bei größerem tRNA-Überschuß wird auch die A-Stelle mit tRNA besetzt. Die Tatsache, daß die Bindung beider Indikator-tRNAs vollständig inhibiert wird, zeigt im übrigen schon, daß von beiden tRNA-Arten zumindest zwei Moleküle gleichzeitig am Ribosom gebunden werden.

Aus den sigmoiden Titrationskurven wurde mit dem in Kapitel 4.2. abgeleiteten Auswertungsformalismus die tRNA-Bindungsaktivität beider Bindungsstellen durch nicht-lineare Regression berechnet. Die Analyse ergab, daß die P- und A-Stelle mit einer Stöchiometrie von 0.65 bzw. 1.3 gefüllt wird (Pfeile in Abb. 3), d.h. beide Bindungsstellen weisen dieselbe tRNA-Bindungsaktivität auf. Der Berechnung wurden Extinktionswerte für Ribosomen und tRNA von 23 und 1750 pmol/A₂₆₀-Einheit zugrundegelegt, die die z. Zt. besten Werte darstellen (van Holde & Hill, 1974; Guéron & Leroy, 1978). Da auch für sehr hoch angereicherte N-AcPhe-tRNA^{Phe} (1650 pmol/A₂₆₀-Einheit) identische Werte für die tRNA-Bindungsaktivität erhalten wurden, kann man davon ausgehen, daß die verwendeten tRNA-Präparationen voll aktiv waren. Aus dieser Über-

Abb. 3: Indikatorbindungstest der P- und A-Stelle.

Zu Poly(U)-programmierten Ribosomen in Puffer A (20 mM Mg²⁺) wurden steigende Mengen an A) deacylierter tRNA^{Phe} oder B) N-Ac(¹⁴C)Phe-tRNA^{Phe} (spezifische Radioaktivität 10 Ci/mol) aus Hefe zugegeben. Danach wurden bei den Indikator-titrationsen der P-Stelle (Δ) die Reaktionsansätze mit N-Ac(¹⁴C)Phe-tRNA^{Phe} (504 Ci/mol) versetzt, 15 min inkubiert und schließlich die Puromycinreaktion durchgeführt. Die Indikator-titrationsen der A-Stelle (O) wurden durch die Zugabe von (¹⁴C)Phe-tRNA^{Phe}·EF-Tu·GTP (504 Ci/mol; 15% relativ zu Ribosomen) gestartet; nach 30 s wurde gebundene Phe-tRNA^{Phe} durch Nitrocellulosefiltration bestimmt. Die Ordinatenangaben sind bezogen auf die eingesetzte Menge an Indikator-tRNA. Zur Berechnung der tRNA-Bindungsaktivität der P- bzw. A-Stelle wurden die Titrationsdaten mit nicht-linearer Regression ausgewertet; die hierzu benötigten Modelle und Gleichungen sind im Teil 4 dieser Arbeit erläutert. Die durchgezogenen Linien stellen die jeweilige Anpassung dar. Beide Bindungsstellen waren zu 65% aktiv; aus den gepunkteten Linien ist dieser Anteil aktiver P- bzw. P- und A-Stellen zu ersehen.



legung ergibt sich für die Ribosomen eine Aktivität von 65%, was durchaus vergleichbar ist mit publizierten Daten anderer Gruppen (Odinzov & Kirillov, 1978; Chinali & Parmeggiani, 1980; Jelenc, 1980; Schmitt et al., 1981).

Die gepunkteten Linien in Abb. 3 zeigen übrigens eindrucksvoll die Notwendigkeit einer Computeranalyse der Kurven. Eine Inspektion der Daten ohne rechnerische Hilfe kann leicht zu einer Überschätzung der Ribosomenaktivität führen. Es sollte ergänzt werden, daß die gewählte Menge an Indikator-tRNA (10-30% relativ zu Ribosomen) ein Optimum für diese Art der Analyse darstellt. Durch einen größeren Anteil wird der für die Auswertung wichtige Kurvenabfall unschärfer; zu geringe Mengen andererseits können gerade im steilen Abschnitt der Kurve eine zu hohe Indikatorbindung durch einen - wenn auch sehr langsamen (s. 2.2.2.) - Austausch zuerst gebundener mit Indikator-tRNA vortäuschen.

2.1.2. Ribosomen binden zwei Moleküle N-AcPhe-tRNA^{Phe}

Zur Bestimmung der Zahl der Bindungsstellen für N-AcPhe-tRNA^{Phe} auf Poly(U)-programmierten Ribosomen wurden Sättigungstitrationen bei konstanter Ribosomenkonzentration (um 0.3 μ M) durchgeführt und N-Ac(¹⁴C)Phe-tRNA^{Phe} (hohe spezifische Radioaktivität) bis zum 20fachen Überschuß zugegeben. Die Menge gebundener N-AcPhe-tRNA^{Phe} wurde mit dem Filterbindungstest, die Bindungsstelle mit der Puromycinreaktion bestimmt. In parallelen Experimenten wurden die Indikatortitrationen mit N-Ac(¹⁴C)Phe-tRNA^{Phe} (niedrige spezifische Radioaktivität) durchgeführt, um die aktuelle Ribosomenaktivität zu ermitteln.

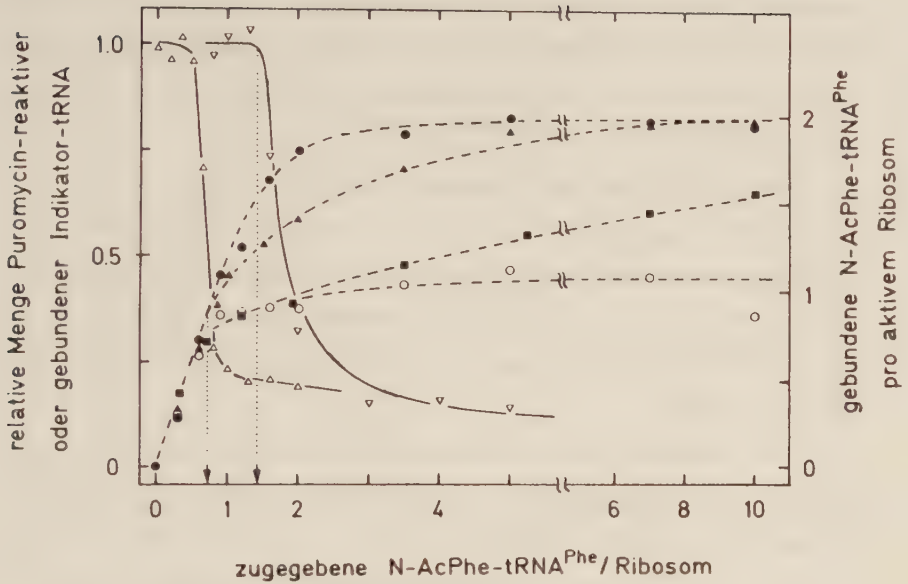


Abb. 4: Sättigungstitrationen Poly(U)-programmierter Ribosomen mit N-AcPhe-tRNA^{Phe}.

Die Titrationen wurden in Puffer A bei 20 mM Mg²⁺ (●, O) und in Puffer B bei 10 (▲) und 6 (■) mM Mg²⁺ durchgeführt, wobei die Konzentration an N-Ac(¹⁴C)Phe-tRNA^{Phe} (504 Ci/mol) variiert wurde. Gebundene N-AcPhe-tRNA^{Phe} wurde bestimmt durch Nitrocellulosefiltration (geschlossene Symbole) und die Puromycinreaktion (O). In parallelen Versuchen mit N-Ac(¹⁴C)Phe-tRNA^{Phe} (10 Ci/mol) wurde bei 20 mM Mg²⁺ mit den Indikatortitrationen der P- (Δ) und A-Stelle (▽) eine Ribosomenaktivität von 65% ermittelt (vgl. Abb. 3).

Beispiele für solche Experimente sind in Abb. 4 dargestellt. Bei Mg²⁺-Konzentrationen zwischen 10 und 20 mM wurden pro Mol Ribosomen 1.3 ± 0.1 Mol N-AcPhe-tRNA^{Phe} gebunden, d.h. unter Berücksichtigung der Ribosomenaktivität von 65% zwei Moleküle aufgenommen. Nach der Puromycinreaktivität in den Sättigungstitrationen und nach den Indikatortitrationen war das Ribosomen-

gebundene Material ungefähr gleich zwischen der zuerst besetzten P-Stelle und der A-Stelle verteilt. (Die Probleme bei der Interpretation der ersten Methode werden im Abschnitt 2.2.3. ausführlich behandelt.)

Bei niedrigeren Mg^{2+} -Konzentrationen wurden stark biphasische Titrationskurven erhalten, die einen markanten Affinitätsunterschied zwischen der P- und A-Stelle andeuten. So wurde z.B. bei 6 mM Mg^{2+} (Abb. 4) auch bei einem zehnfachen Überschuß an N-AcPhe-tRNA^{Phe} über Ribosomen die schwächere A-Stelle nur etwa zur Hälfte gesättigt.

Die Indikatortitrationsen in Abb. 4 erlauben eine für die Reihenfolge der Besetzung der beiden Bindungsstellen wichtige Aussage. Die Zugänglichkeit der P-Stelle für Indikator-tRNA ist bereits völlig blockiert, wenn gerade erst ein Molekül N-AcPhe-tRNA^{Phe} pro aktivem Ribosom gebunden ist. Die ribosomale P-Stelle wird also vollständig mit tRNA gefüllt, bevor die A-Stelle besetzt wird (deGroot et al., 1971; Watanabe, 1972; s. auch 4.1.1.).

Zur quantitativen Auswertung des Plateaus bei Sättigungstitrationen mit N-AcPhe-tRNA^{Phe} ist es wichtig, sehr gut beladene N-AcPhe-tRNA^{Phe} (> 1400 pmol/ A_{260} -Einheit) zu verwenden. Verunreinigungen durch deacylierte tRNA^{Phe} führen zu Komplikationen, die neben Affinitätsunterschieden der beiden tRNA-Arten in den verschiedenen Bindungsstellen vor allem auf die Existenz einer zusätzlichen, für deacylierte tRNA spezifischen Bindungsstelle (E-Stelle; s. 2.1.3.) zurückzuführen sind. Dies wird in Abb. 5 demonstriert. In parallel durchgeführten Titrationsen wurde der Beladungszustand von N-AcPhe-tRNA^{Phe} durch die Zugabe verschiedener Mengen deacylierter tRNA^{Phe} variiert. Da im Filterbindungs-

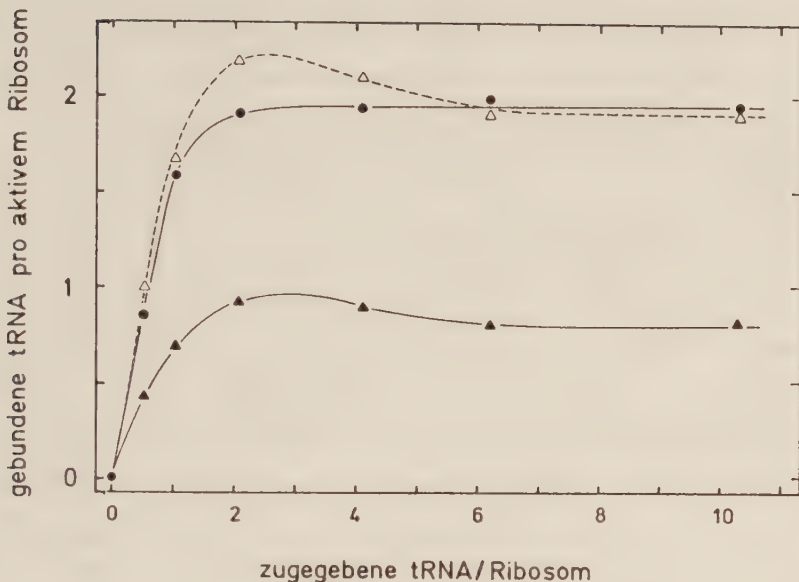


Abb. 5: Einfluß des Beladungszustandes der tRNA^{Phe} bei der Bindung von N-AcPhe- tRNA^{Phe} an Poly(U)-programmierte Ribosomen.

Die Titrationen wurden wie in Abb. 4 bei 20 mM Mg^{2+} (Puffer A) durchgeführt. Allerdings wurde N-AcPhe- tRNA^{Phe} verwendet, die entweder 5% (●) oder 58% (▲) deacylierte tRNA^{Phe} enthielt. Die mit offenen Symbolen dargestellten Datenpunkte wurden unter Berücksichtigung des Beladungsgrades aus den Originaldaten berechnet, um einen direkten Vergleich der beiden Titrationen zu ermöglichen.

test nur gebundene N-Ac(^{14}C)Phe- tRNA^{Phe} erfaßt wird, spiegelt sich eine niedrige Beladung direkt in einem niedrigen Bindungsniveau wieder. In Gegenwart signifikanter Mengen deacylierter tRNA^{Phe} ist es jedoch nicht ausreichend, aus dem bekannten Beladungszustand der N-AcPhe- tRNA^{Phe} auf das tatsächliche Titrationsplateau zu schließen (unterbrochene Linie in Abb. 5). Dieses muß auch bei genügend hohem Überschuß an N-AcPhe- tRNA^{Phe} bestimmt

werden, da die Bindung der deacylierten tRNA^{Phe} in die E-Stelle dazu führt, daß im ersten Bereich der Titration relativ mehr N-AcPhe- tRNA^{Phe} in die P- und A-Stelle gebunden wird als in späteren Titrationspunkten, bei denen dieser Verlust an tRNA^{Phe} in die E-Stelle nicht mehr signifikant ins Gewicht fällt (ab etwa sechsfachem Überschuß; Abb. 5).

Die Ergebnisse demonstrieren eindeutig, daß pro aktivem, Poly(U)-programmiertem Ribosom zwei Moleküle N-AcPhe- tRNA^{Phe} gebunden werden. Damit läßt sich die Existenz einer dritten ribosomalen Bindungsstelle, die N-AcPhe- tRNA^{Phe} mit einer höheren Affinität als 10^5 M^{-1} bindet, ausschließen. Die Daten bestätigen frühere Arbeiten (deGroot et al., 1971; Odinzov & Kirillov, 1978) sowie neuere, im Laufe dieser Arbeit erschienene Publikationen (Schmitt et al., 1981; 1982; Kirillov & Semenov, 1982).

Im Gegensatz dazu steht die Behauptung von Rheinberger et al. (1981), daß ein Molekül N-AcPhe- tRNA^{Phe} in der P-Stelle die Bindung eines zweiten Moleküls in die A-Stelle verhindere. Wie aus gemeinsamen Vergleichsexperimenten (o. Abb.) hervorging, ist diese Beobachtung nicht durch Unterschiede in den Ribosomenpräparationen zu erklären. Wie Indikatorbindungstest und Sättigungstitrationen mit 90% beladener N-AcPhe- tRNA^{Phe} zeigten, besitzen auch die bei niedriger Salzkonzentration isolierten Ribosomen (Rheinberger & Nierhaus, 1980) eine tRNA -Bindungsaktivität von 60%. Vielmehr führte die Verwendung ungenügend beladener N-AcPhe- tRNA^{Phe} (ca. 60%) und die unkritische Analyse der Puro-mycinreaktivität (s. 2.2.3.) zu der (falschen) Interpretation des bei 1.0 N-AcPhe- tRNA^{Phe} /Ribosom erhaltenen Titrationsplateaus, die Ribosomen seien 100% aktiv und würden nur ein Molekül N-AcPhe- tRNA^{Phe} binden (Rheinberger et al., 1981).

2.1.3. Eine zusätzliche, dritte Bindungsstelle für deacylierte tRNA^{Phe}

Die Bestimmung der Zahl der Bindungsstellen für deacylierte tRNA^{Phe} wurde mit (³²P)-markierter tRNA^{Phe} aus *E. coli* und Hefe vorgenommen (s. 5.1.5.). Die Sättigungstitrationen wurden wie in Abschnitt 2.1.2. beschrieben durchgeführt. Parallel dazu wurde wieder mit dem Indikatorbindungstest die Aktivität der Ribosomen für die Bindung in die P- und A-Stelle bestimmt.

Bei 20 mM Mg²⁺-Konzentration (Abb. 6) wurde ein Titrationsplateau bei 3.0 ± 0.1 tRNAs pro aktivem Ribosom erhalten. Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich bei 15 mM Mg²⁺ (o. Abb.). Offensichtlich besitzen Poly(U)-programmierte Ribosomen zusätzlich zur P- und A-Stelle eine weitere Bindungsstelle, die spezifisch für deacylierte tRNA^{Phe} ist. Die Tatsache, daß auch diese Bindungsstelle pro Mol Ribosomen 0.65 Mol tRNA^{Phe} aufnimmt, zeigt, daß alle ribosomalen Bindungsstellen eine einheitliche tRNA-Bindungsaktivität aufweisen.

Die Ergebnisse bestätigen die Existenz einer dritten ribosomalen Bindungsstelle, die für Ribosomen aus *E. coli* erstmals von Rheinberger et al. (1981) beschrieben und in der Folge auch von anderen Autoren gefunden wurde (Grajevskaja et al., 1982; Kirillov et al., 1983). Nach dem Vorschlag von Rheinberger et al. (1981) wird diese Bindungsstelle im folgenden E-Stelle (E steht für "exit") genannt.

Der Indikatorbindungstest der A-Stelle macht einen interessanten Unterschied zwischen den beiden tRNA^{Phe}s deutlich (Abb. 6). Bei der heterologen tRNA^{Phe} aus Hefe ist die Bindung des ternären Komplexes schon fast vollständig inhibiert, wenn gerade

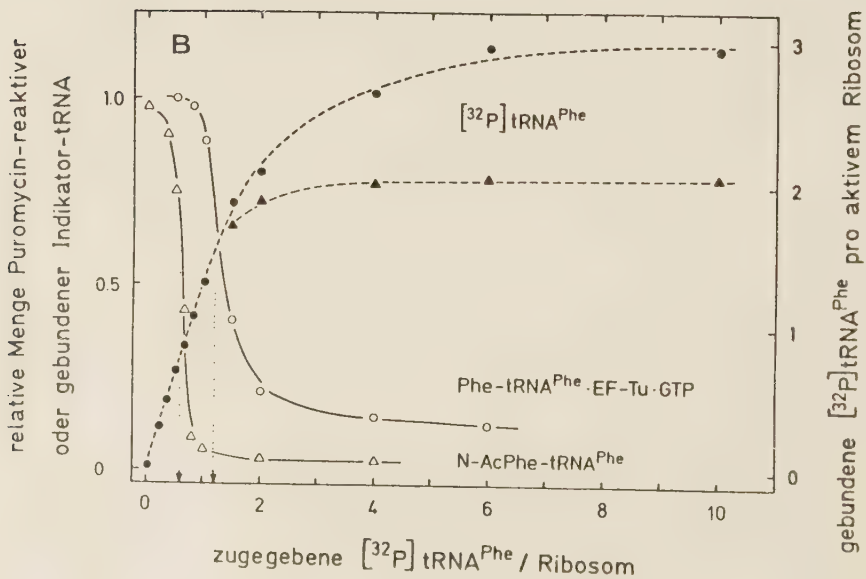
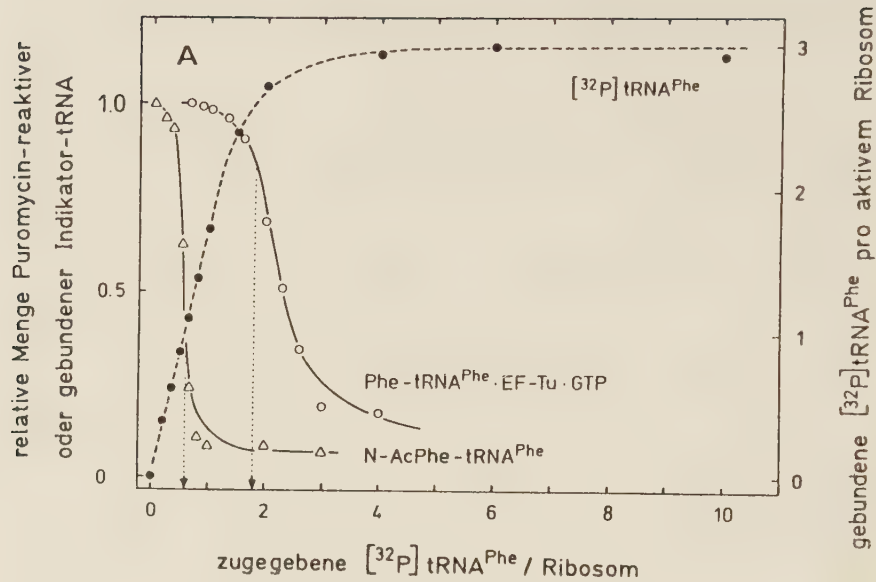


Abb. 6: Sättigungstitrationen Poly(U)-programmierter Ribosomen mit deacylierter tRNA^{Phe} aus A) E. coli und B) Hefe bei 20 mM Mg²⁺.

Die Titrationen wurden mit (³²P)-markierter tRNA^{Phe} in Puffer A durchgeführt und die Komplexbildung mit der Nitrocellulosefiltration verfolgt, wobei die Reaktionslösungen entweder direkt (●) oder nach vorheriger Verdünnung mit Puffer (▲) auf das Filter pipettiert wurden. Ein Teil des Reaktionsansatzes wurde für die Durchführung des Indikatorbindungstests zur Bestimmung der tRNA-Bindungsaktivität der P- (Δ) und A-Stelle (○) verwendet; die sigmoiden Kurven wurden wie in Abb. 3 ausgewertet und dargestellt.

erst zwei Moleküle tRNA^{Phe} pro Ribosom gebunden sind. Da der ternäre Komplex als Indikator in diesen Experimenten im Unterschuß zu Ribosomen (15%) eingesetzt wurde und er daher nur das Auffüllen des letzten Teils freier A-Stellen detektiert, bedeutet dies, daß die E-Stelle erst nach der A-Stelle besetzt wird.

Im Vergleich dazu ist die Indikator titrationskurve der A-Stelle für die homologe tRNA^{Phe} aus E. coli deutlich verschoben. Dies bedeutet, daß die A-Stelle entweder gleichzeitig mit der E-Stelle oder nach ihr besetzt wird. Nur mit dieser Annahme für das Bindungsverhalten ergab die Analyse der Daten (s. 4.2.) konsistente Ergebnisse, d.h. eine Ribosomenaktivität von 65%. Wie in einem späteren Kapitel (s. 2.2.2.) beschrieben wird, liegt die Ursache für die unterschiedliche Besetzungsreihenfolge der A- und E-Stelle in einer zehnmal geringeren Stabilität des heterologen E-Stellen-Komplexes. Die ausgeprägte Labilität der Bindung dieser tRNA^{Phe} in die E-Stelle kommt auch darin zum Ausdruck, daß nur dann eine Stöchiometrie von drei tRNAs/Ribosom zu beobachten war, wenn in der Sättigungstitration der Reaktionsansatz direkt und ohne vorherige Verdünnung durch das Nitrocellulose-Filter gesaugt wurde (Abb. 6B).

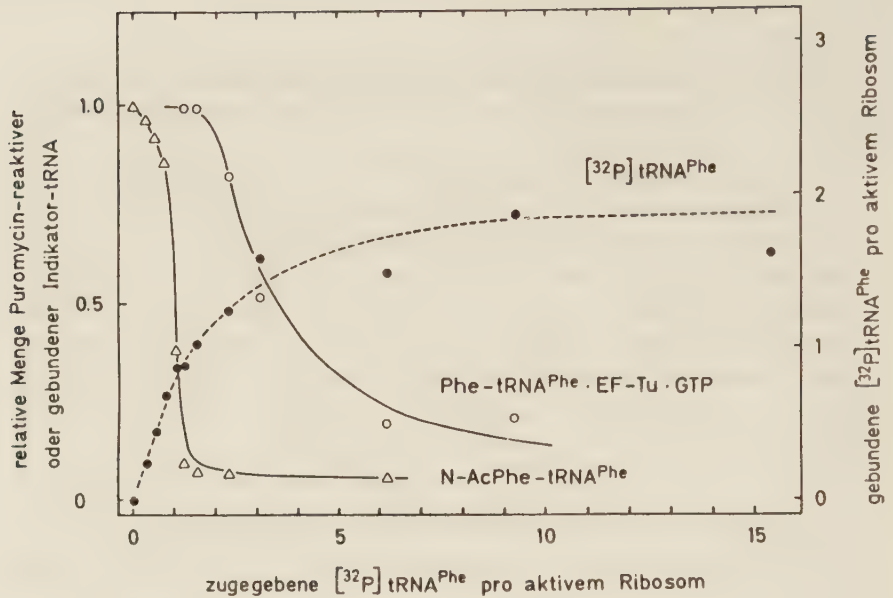


Abb. 7: Sättigungstitrationen Poly(U)-programmierter Ribosomen mit deacylierter tRNA^{Phe} aus Hefe bei 10 mM Mg²⁺.

Die Titration wurde entsprechend Abb. 6 in Puffer B durchgeführt. Die Indikator-titrationen wurden wie in Abb. 3 durchgeführt und ausgewertet.

Bei 10 mM Mg²⁺-Konzentration war - ähnlich wie bei Titrationen mit N-AcPhe-tRNA^{Phe} - zur Sättigung der A- und E-Stelle mit tRNA^{Phe} aus E. coli ein wesentlich höherer tRNA-Überschuß notwendig. Die Affinität beider Bindungsstellen ist zu gering, um bei den gewählten Konzentrationsbedingungen ein stöchiometrisches Auffüllen zu gewährleisten. Mit der heterologen tRNA^{Phe} aus Hefe wurden unter diesen Bedingungen nur 2.0 ± 0.2 tRNAs pro aktivem Ribosom gebunden; nach den Indikator-titrationen handelt es sich dabei um die P- und A-Stelle (Abb. 7). tRNA^{Phe} aus Hefe bindet bei dieser Mg²⁺-Konzentration zu labil in die E-Stelle, um noch mit der Filterbindungsmethode erfaßt werden zu können.

2.1.4. tRNA-Bindung in Abwesenheit von mRNA

In Abwesenheit von Poly(U) als mRNA binden aktive Ribosomen nur 1.0 ± 0.2 Molekül N-AcPhe-tRNA^{Phe} (Abb. 8), welche nach der Puromycinreaktivität ausschließlich in der P-Stelle lokalisiert ist (o. Abb.). Eine Bindung in die A-Stelle war weder mit der Filtrationstechnik noch mit der Fluoreszenzmessung nachweisbar.

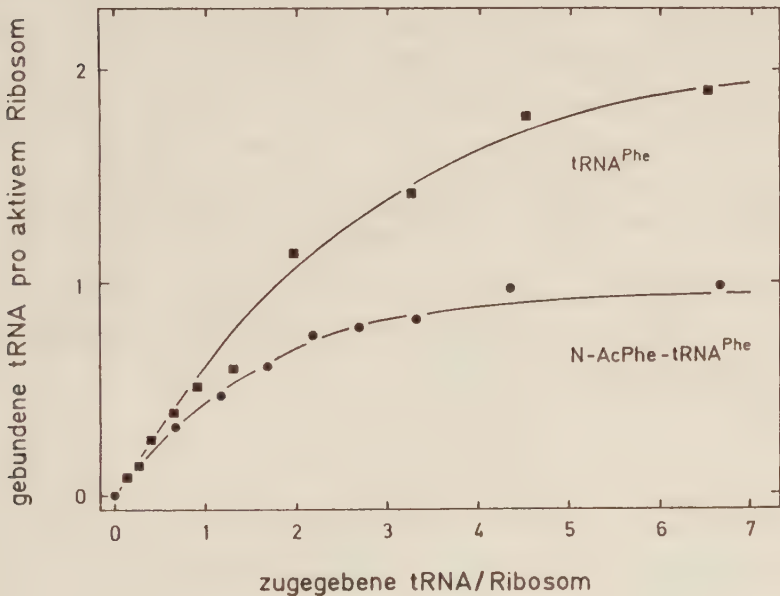


Abb. 8: Zahl der ribosomalen tRNA-Bindungsstellen in Abwesenheit von mRNA.

N-Ac(¹⁴C)Phe-tRNA^{Phe} oder (³²P)tRNA^{Phe} aus E. coli wurden in Puffer A (20 mM Mg²⁺) mit unprogrammierten Ribosomen inkubiert und gebundene tRNA mit dem Filterbindungstest bestimmt. Zur Angabe der relativen Menge gebundener tRNA wurde eine Ribosomenaktivität von 65% verwendet.

Von der deacylierten tRNA^{Phe} werden 2.0 +- 0.3 Moleküle pro aktivem Ribosom gebunden (Abb. 8). Mit der Annahme, daß auch für diese tRNA-Art eine Bindung in die A-Stelle nicht nachweisbar ist, folgt aus diesem Befund, daß in Abwesenheit von mRNA neben der P-Stelle auch die E-Stelle besetzt wird. Die Bindung in beiden Bindungsstellen ist allerdings sehr labil und erforderte zu ihrem Nachweis eine sehr vorsichtige Filtration. Die Bindung einer zusätzlichen, nicht in der P-Stelle lokalisierten tRNA konnte mit der Fluoreszenzmethode bestätigt werden. Die Zugabe verschiedener Proflavin-tRNA-Derivate zu Ribosomen, deren P-Stelle mit N-AcPhe-tRNA^{Phe} blockiert war, führte zu einem beträchtlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität (relativ zu freier tRNA um 50% bei tRNA^{Phe}_{Prf16/20} aus E. coli und um 35% bei tRNA^{Phe}_{Prf16/17} aus Hefe). In Abwesenheit von mRNA läßt sich für N-AcPhe-tRNA^{Phe} also nur die Bindung in die P-Stelle und für deacylierte tRNA^{Phe} zusätzlich die Bindung in die E-Stelle nachweisen, während für die Bindung in die A-Stelle die Anwesenheit des passenden Codons notwendig ist.

2.2. Methodische Vorbereitung der Gleichgewichtstitrationen

Die P- (und A-)Stellen Poly(U)-programmierter Ribosomen können mit stöchiometrischen Mengen deacylierter tRNA^{Phe} aus Hefe oder mit N-AcPhe-tRNA^{Phe} vollständig blockiert werden (s. Abb. 4 und 6). Dieses Verhalten und die große kinetische Stabilität der P- und A-Stellen-Komplexe (s.u.) wurde in dieser Arbeit dazu benutzt, um die noch unbesetzten tRNA-Bindungsstellen getrennt von den blockierten zu untersuchen. Der experimentelle Ansatz ist im Teil 4 ("Theoretischer Teil") näher erläutert. In diesem Kapitel sollen die methodischen Voraussetzungen für ein solches Vorgehen dargestellt werden.

2.2.1. Geschwindigkeit der tRNA-Bindung in die P-, A- und E-Stelle

Gleichgewichtsmessungen erfordern u.a. die Kenntnis der Reaktionsgeschwindigkeiten der untersuchten Partner. Für die drei ribosomalen tRNA-Bindungsstellen wurden sehr unterschiedliche Assoziationsgeschwindigkeiten mit tRNA beobachtet. So bindet sowohl deacylierte tRNA^{Phe} als auch N-AcPhe-tRNA^{Phe} im Bereich von Sekunden in die P-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen (Wintermeyer & Robertson, 1982). Dies ist auch ersichtlich aus der schnellen ersten Phase der Kurven in Abb. 9, welche die Bindung deacylierter (³²P)tRNA^{Phe} und N-Ac(¹⁴C)Phe-tRNA^{Phe} an ihre jeweiligen Bindungsstellen zeigt. Dabei wurde ein Überschuß an tRNA mit Ribosomen vereinigt und nach bestimmten Zeiten gebundene tRNA mit dem Filterbindungstest bestimmt. Aus der Amplitude der Kurve für deacylierte tRNA^{Phe} geht ferner hervor, daß auch die Bindung in die E-Stelle innerhalb weniger Sekunden stattfindet.

Im Gegensatz dazu wird die A-Stelle wesentlich langsamer mit tRNA besetzt (zweite Phase der Kurven in Abb. 9). Dies wurde für die Bindung deacylierter tRNA^{Phe}, Phe-tRNA^{Phe} und N-AcPhe-tRNA^{Phe} genauer untersucht. P-Stellen-blockierte Ribosomen im Überschuß

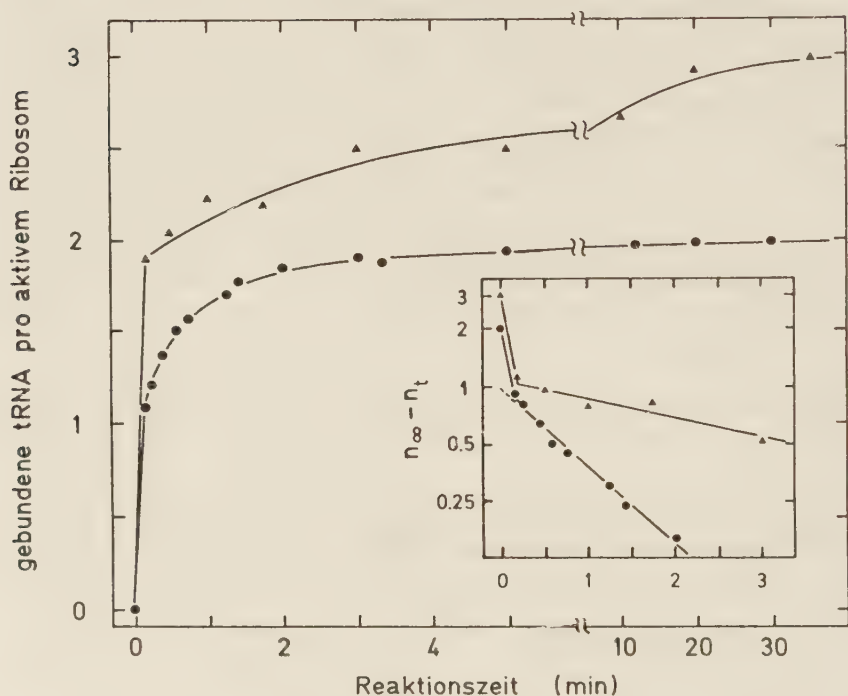


Abb. 9: Geschwindigkeit der Bindung von deacylierter tRNA^{Phe} und N-AcPhe-tRNA^{Phe} an Poly(U)-programmierte Ribosomen.

Zu Poly(U)-programmierten Ribosomen (0.3 μM) in Puffer A (20 mM Mg^{2+}) wurde ein siebenfacher Überschuß an deacylierter tRNA^{Phe} (▲) bzw. ein sechsfacher Überschuß an N-AcPhe-tRNA^{Phe} (●) zugegeben und zu den angegebenen Zeiten gebundene tRNA mit dem Filterbindungstest bestimmt. Zur Verdeutlichung der Biphasizität der Kurven sind die Daten im Einschub halb-logarithmisch aufgetragen; n_t und n_∞ bezeichnen die Menge an N-AcPhe-tRNA^{Phe}, die zur Zeit t bzw. nach Beendigung der Reaktion pro Ribosom gebunden ist.

wurden mit tRNA versetzt und die A-Stellenbindung mit der Nitrocellulosefiltration oder mit der Fluoreszenzmethode verfolgt. Bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 20 mM wurden Halbwertszeiten der Bindung von 5, 3 und 2 min für die drei tRNA-Arten abgeschätzt (Abb. 10), während sich bei 10 mM Mg^{2+} Werte von 25, 20 und 15

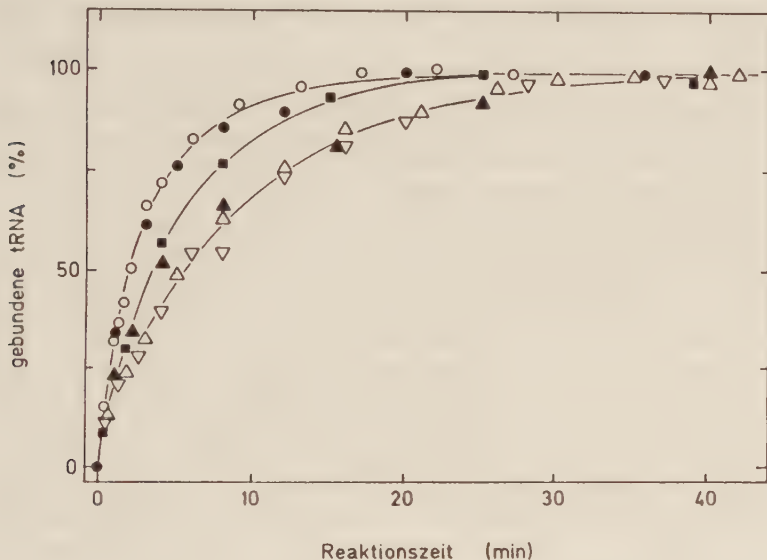


Abb. 10: Geschwindigkeit der tRNA-Bindung in die A-Stelle.

Poly(U)-programmierte Ribosomen ($0.1 \mu M$), deren P-Stelle mit deacylierter tRNA^{Phe} blockiert war, wurden in Puffer A (20 mM Mg^{2+}) mit radioaktiv-markierter (geschlossene Symbole) oder fluoreszierender (offene Symbole) tRNA ($0.06 \mu M$) versetzt und die Komplexbildung zu den angegebenen Zeiten durch Filterbindung oder Fluoreszenzmessung bestimmt. Die Blindwerte in Abwesenheit von Ribosomen wurden jeweils abgezogen. N-Ac(¹⁴C)Phe-tRNA^{Phe} (●), (¹⁴C)Phe-tRNA^{Phe} (■), (³²P)tRNA^{Phe} (▲). Bei tRNA^{Phe}_{Prf16/17} (▽) wurde die Fluoreszenzemission des Proflavins, bei tRNA^{Phe} (Δ) und N-AcPhe-tRNA^{Phe} (O) aus Hefe die des Wybutins als Meßgröße benutzt.

min (o. Abb.) ergaben. Offensichtlich assoziiert unbeladene tRNA^{Phe} ca. zweimal langsamer mit der A-Stelle als beladene tRNA^{Phe} . Im übrigen demonstriert die Unabhängigkeit der Ergebnisse von der benutzten Meßgröße auch die Eignung beider Methoden zur Untersuchung der tRNA-Bindung an Ribosomen.

Für die Inkubationsbedingungen zur nicht-enzymatischen Bindung von tRNA an Poly(U)-programmierte Ribosomen folgt aus diesen Resultaten, daß die P- und E-Stelle schon nach wenigen Sekunden untersucht werden kann, während zur Bindung in die A-Stelle abhängig von der tRNA-Art und der Mg^{2+} -Konzentration mehrere Minuten bis Stunden gewartet werden muß. Dagegen erfolgt die Bindung des ternären Komplexes $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}} \cdot \text{EF-Tu} \cdot \text{GTP}$ in die A-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen innerhalb von Sekunden (o. Abb.).

In Abwesenheit von Poly(U) ist die Bindung von N-AcPhe- tRNA^{Phe} in die P-Stelle drastisch verlangsamt und benötigt z.B. bei 20 mM Mg^{2+} ca. 5 min zur vollständigen Bindung (o. Abb.). Deacylierte tRNA^{Phe} hingegen bindet in die P- und E-Stelle innerhalb von Sekunden. Für die E-Stelle ist das Ergebnis wegen der weitgehenden Codon-Unabhängigkeit der Bindung (s. 2.4.) verständlich. Der deutliche Unterschied zwischen beladener und unbeladener tRNA in der P-Stelle ist vermutlich auf eine Bindung der beiden tRNA-Arten in verschiedenen Zuständen zurückzuführen und wird, da für den Dissoziationsschritt ähnliche Unterschiede beobachtet wurden, erst im folgenden Abschnitt näher diskutiert.

2.2.2. Stabilität der tRNA-Bindung in die P-, A- und E-Stelle

Die Verwendung von Ribosomen, deren P- (und A-)Stelle spezifisch mit tRNA blockiert ist, setzt voraus, daß während der Dauer eines Experiments kein wesentlicher Austausch zwischen untersuchter und blockierender tRNA stattfindet. Zur Klärung der Frage wurden die Stabilitäten Ribosomen-gebundener tRNAs unter verschiedenen experimentellen Bedingungen studiert. Die jeweilige tRNA-Art wurde in die fragliche Bindungsstelle gebunden und ihre Dissoziation nach Zugabe eines Überschusses an unmarkierter tRNA oder nach starker Verdünnung des Reaktionsansatzes verfolgt.

Die Bindung deacylierter tRNA^{Phe} und N-AcPhe-tRNA^{Phe} in die P- und A-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen ist äußerst stabil. Wie in Verdrängungsexperimenten in Abb. 11 gezeigt wird, dissoziiert z.B. deacylierte tRNA^{Phe} aus der P-Stelle bei 20 mM Mg²⁺ mit einer Halbwertszeit von mehr als 10 h; tRNA^{Phe} in der A-Stelle hingegen wird wesentlich schneller verdrängt. Ungefähr das umgekehrte Verhalten wurde für die Dissoziation von N-AcPhe-tRNA^{Phe} beobachtet.

Tab. 1 faßt die für verschiedene Pufferbedingungen und tRNA-Arten erhaltenen Ergebnisse zusammen. In nahezu allen untersuchten Fällen war die tRNA-Bindung hinreichend stabil, um den experimentellen Ansatz der Blockierung der P- und A-Stelle zu rechtfertigen. Für die P-Stelle eignen sich dabei sowohl deacylierte tRNA^{Phe} als auch N-AcPhe-tRNA^{Phe}, während für die A-Stelle N-AcPhe-tRNA^{Phe} wegen ihrer wesentlich langsameren Dissoziation vorzuziehen ist.

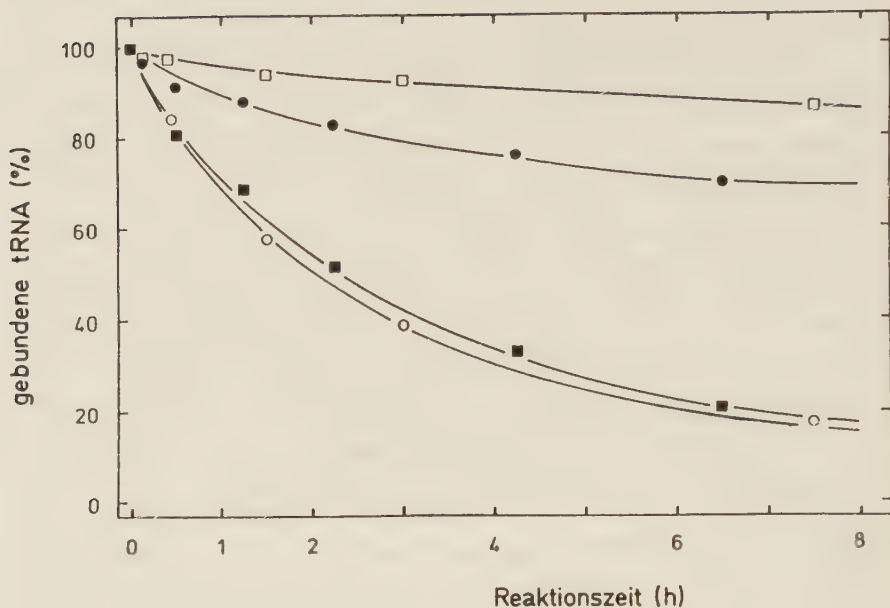


Abb. 11: Stabilität der tRNA-Bindung in der P- und A-Stelle.

Zur Bindung in die P-Stelle wurden entweder (³²P)tRNA^{Phe} (□) oder N-Ac(¹⁴C)Phe-tRNA^{Phe} (■, jeweils 1.4×10^{-8} M) aus Hefe mit Poly(U)-programmierten Ribosomen (2.0×10^{-8} M) in Puffer A (20 mM Mg²⁺) inkubiert; zur Bindung dieser tRNAs in die A-Stelle (○, ●; 1.4×10^{-7} M) wurden die Ribosomen (2.0×10^{-7} M) zunächst mit nicht-markierter, deacylierter tRNA^{Phe} (2.5×10^{-7} M) versetzt, um die P-Stelle zu blockieren. Dann wurde ein zehnfacher Überschuß an nicht-markierter tRNA^{Phe} aus Hefe zugegeben und zu den angegebenen Zeiten die Menge an radioaktiv-markierter tRNA, die noch in der P- bzw. A-Stelle gebunden war, mit dem Filterbindungstest bestimmt. Die Ordinatenangaben sind bezogen auf die vor der Zugabe von tRNA^{Phe} gebundene, markierte tRNA.

Tab. 1: Die Stabilität der Bindung von tRNA^{Phe} und N-AcPhe-tRNA^{Phe} in der P- und A-Stelle

Bindungs- stelle	Puffer (mM Mg ²⁺)	Poly(U)	Halbwertszeiten der deacylierte tRNA ^{Phe}	Dissoziation (h) N-AcPhe-tRNA ^{Phe}
P-Stelle	A (20)	+	>10	2
	A (20)	-	<0.01	0.5
	B (10)	+	10	10
A-Stelle	A (20)	+	2	10
	B (10)	+	0.5	10

Die Daten wurden bestimmt wie in Abb. 11 beschrieben. Vergleichbare Ergebnisse wurden erhalten, wenn die Dissoziation der tRNA durch Zugabe eines zehnfachen Überschusses an N-AcPhe-tRNA^{Phe} oder durch einen Verdünnungssprung eingeleitet wurde.

Die Stabilität der Bindung von deacylierter tRNA^{Phe} und N-AcPhe-tRNA^{Phe} in die A-Stelle wurde auch in Gegenwart des ternären Komplexes Phe-tRNA^{Phe}·EF-Tu·GTP getestet (o. Abb.). Dabei kann man davon ausgehen, daß eine frei gewordene A-Stelle ausschließlich durch den sehr schnell bindenden ternären Komplex wiederbesetzt wird. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit den in Tab. 1 zusammengefaßten Daten. Die Stabilität der tRNA-Bindung scheint also auch unter den Bedingungen des Indikatorbindungstests der A-Stelle ausreichend zu sein.

Ein gänzlich anderes Verhalten findet man für die Bindung deacylierter tRNA^{Phe} in die E-Stelle. So verläßt tRNA^{Phe}_{Prf16/20} aus E. coli die E-Stelle mit einer Halbwertszeit von ca. 20 s (ohne Abb.); im Vergleich dazu dissoziiert die heterologe tRNA^{Phe}_{Prf16/17} aus Hefe zehnmal schneller (Wintermeyer et al., 1985a). Wegen der

ausgeprägten kinetischen Labilität der E-Stellen-Komplexe sind Gleichgewichtsmethoden wie z.B. Fluoreszenzmessungen, welche die Trennung der Reaktionspartner vermeiden, wesentlich besser zum Studium der Eigenschaften der E-Stelle geeignet. Aus demselben Grund ist eine spezifische Blockierung der E-Stelle nicht durchführbar.

Im Vergleich zu Poly(U)-programmierten Ribosomen wurde in Abwesenheit von mRNA eine starke Abnahme der Stabilität der P-Stellen-Komplexe beobachtet. So sinkt die Halbwertszeit der Dissoziation für N-AcPhe-tRNA^{Phe} von 2 h auf 30 min und für deacylierte tRNA^{Phe} von mehr als 10 h auf unter eine Minute (Tab. 1). Die erheblich geringere Stabilität der Bindung deacylierter tRNA^{Phe} erklärt auch den Befund, daß sich gebundene N-AcPhe-tRNA^{Phe} unter diesen Bedingungen nicht gegen deacylierte tRNA^{Phe}, sondern nur gegen N-AcPhe-tRNA^{Phe} austauschen läßt. Die beträchtlichen Stabilitätsunterschiede, wie auch die oben erwähnten Unterschiede in der Bindungsgeschwindigkeit (2.2.1), deuten darauf hin, daß in Abwesenheit von mRNA deacylierte tRNA^{Phe} und N-AcPhe-tRNA^{Phe} unterschiedlich in die P-Stelle gebunden sind. So könnte z.B. die Wechselwirkung des N-AcPhe-Restes mit dem Ribosom dazu führen, daß N-AcPhe-tRNA^{Phe} in einem anderen Zustand als deacylierte tRNA^{Phe} in der nicht-programmierten P-Stelle gebunden ist.

Abschließend soll ergänzt werden, daß die - wenn auch in manchen Fällen äußerst langsame - Dissoziation der tRNAs vom Ribosom die Reversibilität der Komplexbildung (Odinzov & Kirilov, 1978) beweist, was ja eine unabdingbare Voraussetzung jeder Gleichgewichtsuntersuchung ist.

2.2.3. Reaktionen mit Puromycin

Puromycin ähnelt in seiner chemischen Struktur dem 3'-terminalen Phenylalanyladenosinge einer Phe-tRNA und kann Aminoacyl-tRNA als Akzeptor des Peptidylrests in der Peptidyltransfer-Reaktion ersetzen. Das Antibiotikum reagiert mit Peptidyl-tRNA in der P-Stelle, nicht jedoch in der A-Stelle, unter Bildung von Peptidyl-puromycin und wird daher zum Nachweis der P-Stellenbindung einer Peptidyl-tRNA (oder N-AcPhe-tRNA^{Phe}) benutzt (Pestka, 1971; 1977). Für die Durchführung der Gleichgewichtstitrationen der P-Stelle mit N-AcPhe-tRNA^{Phe} wäre ein solches stellenspezifisches Reagenz natürlich sehr vorteilhaft, da man aus der Puromycinreaktivität unmittelbar das Ausmaß der Bindung in die P-Stelle bestimmen könnte.

Die Analyse wird jedoch zum einen dadurch erschwert, daß eine in der A-Stelle gebundene tRNA die Reaktion mit Puromycin stark inhibiert. In Abb. 12 ist dieser Effekt für verschiedene in der A-Stelle gebundene tRNAs gezeigt. Die P-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen wurde mit N-AcPhe-tRNA^{Phe} (hohe spezifische Radioaktivität) besetzt; danach wurden verschiedene tRNAs zur Bindung in die A- (und E-)Stelle zugegeben und die Puromycinreaktion gestartet. Ein zweifacher Überschuß an tRNA^{Phe} aus Hefe oder an N-AcPhe-tRNA^{Phe} (niedrige spezifische Radioaktivität) verlangsamte die Reaktion, die bei freier A-Stelle nach ca. 10 min beendet ist, mindestens zehnfach. Die gleiche Menge an tRNA^{Phe} aus E. coli zeigt nur einen geringen Effekt, da diese tRNA wegen der anderen Reihenfolge der Bindung (s. 2.1.3.) hauptsächlich die E-Stelle besetzt, von der offenbar kein inhibierender Effekt aus-

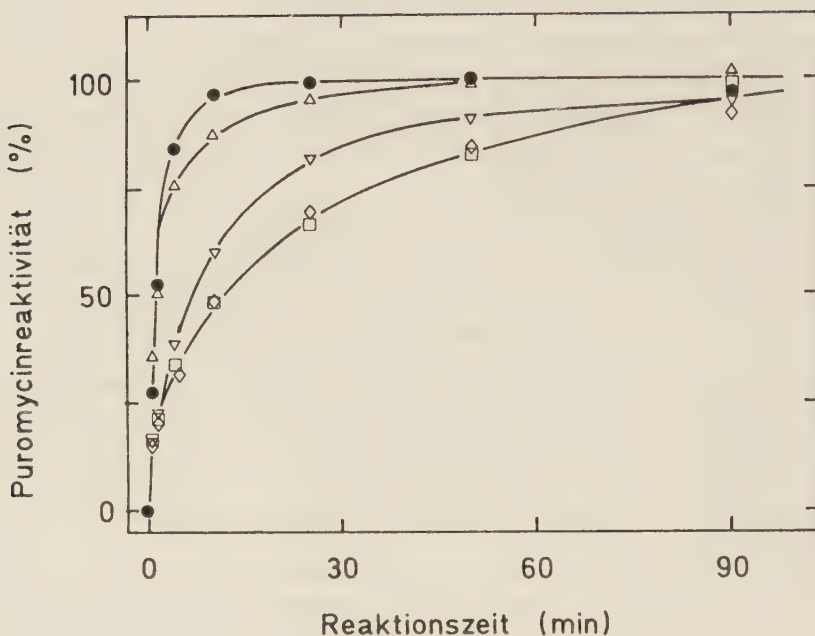


Abb. 12: Inhibierung der Puromycinreaktion bei Besetzung der A-Stelle mit tRNA.

Die P-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen ($0.1 \mu\text{M}$) wurde in Puffer A (20 mM Mg^{2+}) mit $0.08 \mu\text{M N-AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ besetzt. Dann wurden verschiedene tRNAs zugegeben, 30 min inkubiert und anschließend bei 0°C die Puromycinreaktion durchgeführt. Zu den angegebenen Zeiten wurde die Menge an Puromycin-reaktivem Material (relativ zur eingesetzten Menge an $\text{N-AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$) bestimmt; die jeweiligen Blindwerte in Abwesenheit von Ribosomen sind abgezogen. Keine weitere Zugabe ($\bullet$); tRNA^{Phe} aus *E. coli* (Δ), tRNA^{Phe} aus Hefe ($\diamond$) und $\text{N-AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ ($\square$; 10 Ci/mol), jeweils 2.0 mol/mol Ribosomen. tRNA^{Phe} aus *E. coli* (∇), 3.5 mol/mol Ribosomen.

geht. Erst bei höherem tRNA-Überschuß, d.h. bei merklicher Besetzung der A-Stelle, wird eine ähnliche Verlangsamung der Puromycinreaktion wie bei den anderen tRNA-Arten beobachtet.

Es ist bekannt, daß Puromycin die Bindung des Akzeptorarmes einer Aminoacyl-tRNA, z.B. des Fragments CACCA-Phe, an das Ribosom inhibiert. Vermutlich blockiert Puromycin den Bindungsort nahe dem ribosomalen Peptidyltransferasezentrum (Pestka, 1969; Lessard & Pestka, 1972). Die hier beobachtete Inhibierung der Puromycinreaktion bei besetzter A-Stelle deutet ebenfalls auf eine Bindung beider Moleküle an denselben Ort am Ribosom hin, der ein Teil der A-Stelle zu sein scheint. Offenbar kann die Puromycinreaktion nur dann stattfinden, wenn der Akzeptorarm der tRNA nicht an diesem Ort gebunden ist, sondern entweder mit einem anderen Teil des Ribosoms in Wechselwirkung tritt oder ungebunden bleibt.

Wäre die eben geschilderte Komplikation noch durch eine Verlängerung der Reaktionszeit zu umgehen, so stellt eine nicht mehr für die P-Stelle spezifische Nebenreaktion, die im Überschuß von N-AcPhe-tRNA^{Phe} beobachtet wurde, ein schwer kontrollierbares Problem dar (Abb. 13). Zu Poly(U)-programmierten Ribosomen, deren P-Stelle mit deacylierter tRNA^{Phe} blockiert war, wurden verschiedene Mengen N-AcPhe-tRNA^{Phe} zugegeben und der Puromycintest durchgeführt. Bei der Extraktion der wässrigen Phase mit Ethylacetat wird neben Puromycin und N-Ac(¹⁴C)Phe-Puromycin teilweise auch hydrolysiertes N-Ac(¹⁴C)Phe erfaßt. Wie aus der Kontrollreaktion in Abwesenheit von Ribosomen hervorgeht, ist in Gegenwart eines Überschusses an N-AcPhe-tRNA^{Phe} diese Hydrolyse nicht mehr zu vernachlässigen. Die darüberhinaus erfaßte Menge an N-Ac(¹⁴C)Phe ist weder auf die Puromycinreaktivität einer in der

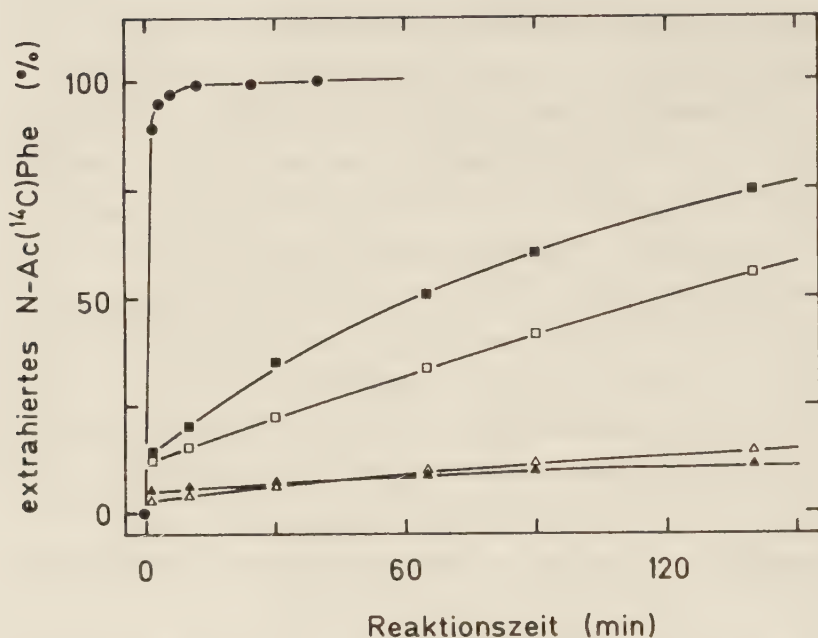


Abb. 13: Puromycinreaktion mit in der P-Stelle blockierten Ribosomen in Gegenwart verschiedener Mengen N-AcPhe-tRNA^{Phe}.

Poly(U)-programmierte Ribosomen (0.06 μ M), deren P-Stelle mit deacylierter tRNA^{Phe} blockiert war, wurden mit 0.7 (▲) bzw. 5.0 (■) Mol N-AcPhe-tRNA^{Phe} pro Mol Ribosomen 30 min in Puffer A (20 mM Mg²⁺) inkubiert. Danach wurde der zeitliche Ablauf der Puromycinreaktion bei 37°C verfolgt. Parallel dazu wurden die Experimente in Abwesenheit von Ribosomen (△, □) durchgeführt. Zum Vergleich ist die Geschwindigkeit der Puromycinreaktion mit ausschließlich in der P-Stelle gebundener N-AcPhe-tRNA^{Phe} gezeigt (●; vgl. Abb. 12).

A-Stelle gebundenen N-AcPhe-tRNA^{Phe} zurückzuführen (Abb. 13) noch mit einem Austausch der deacylierten tRNA^{Phe} aus der P-Stelle zu erklären (vgl. Tab. 1). Obwohl der molekulare Vorgang bei dieser Nebenreaktion unklar ist, scheint N-AcPhe-tRNA^{Phe} unspezifisch mit Puromycin reagieren zu können, ohne in der P- oder A-Stelle des Ribosoms gebunden zu sein. Dieser alternative Reaktionsweg könnte z.B. bei einer transienten Bindung des 3'-Endes der N-AcPhe-tRNA^{Phe} in die Donorstelle des Peptidyltransferasezentrums eingeschlagen werden.

Die beschriebene unspezifische Puromycinreaktion in Gegenwart ungebundener N-AcPhe-tRNA^{Phe} ist im Vergleich zur spezifischen Reaktion zwar relativ langsam (Abb. 13). Für Gleichgewichtstitrationen, in denen zwangsläufig sehr viel ungebundene N-AcPhe-tRNA^{Phe} vorliegt, erscheint die Analyse der Puromycinreaktivität jedoch zu unpräzise. Darüberhinaus wird die Interpretation der Daten dadurch erschwert, daß die Hydrolyse ungebundener N-AcPhe-tRNA^{Phe} schneller als die gebundener abläuft (s. auch Abb. 13). Ein Abzug des Blindwerts in Abwesenheit von Ribosomen stellt deshalb nur eine Näherung dar. In dieser Arbeit wurde die Puromycinreaktion wegen solcher Komplikationen nur in Abwesenheit signifikanter Mengen ungebundener N-AcPhe-tRNA^{Phe} benutzt.

Auch in Abwesenheit von mRNA war die Puromycinreaktivität gebundener N-AcPhe-tRNA^{Phe} keine geeignete Meßgröße zur quantitativen Bestimmung der Bindung in die P-Stelle. Nach dem Transfer des N-AcPhe-Restes wird nämlich die in der P-Stelle verbleibende deacylierte tRNA^{Phe} rasch gegen ungebundene N-AcPhe-tRNA^{Phe} ausgetauscht (Tab. 1), was letztlich dazu führt, daß praktisch alle zugegebene N-AcPhe-tRNA^{Phe} Puromycin-reaktiv ist.

2.3. Affinitäten der ribosomalen tRNA-Bindungsstellen

Die Existenz zweier bzw. dreier Bindungsstellen für beladene bzw. unbeladene tRNA^{Phe} auf Ribosomen aus *E. coli* erschwert die Bestimmung von Bindungskonstanten beträchtlich. Um aus Gleichgewichtstitrationen stellenspezifische Parameter bestimmen zu können, ist zunächst eine genaue Kenntnis des Bindungsverhaltens notwendig (Klotz, 1983). Ein aufgrund biochemischer Informationen abgeleitetes Bindungsmodell ist im Teil 4 dieser Arbeit näher erläutert. Es basiert u.a. darauf, daß die P-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen zuerst besetzt wird und daß keine Wechselwirkungen zwischen den anderen Bindungsstellen existieren. Prinzipiell ist es damit zwar möglich, alle Bindungskonstanten aus einer einzigen Titration aller Bindungsstellen zu bestimmen. Da die Affinitäten für tRNA jedoch sehr verschieden sind, ist - aus technischen Gründen - eine gleichzeitige Bestimmung aller Bindungskonstanten nicht möglich, ohne an Präzision zu verlieren.

In dieser Arbeit wurde erstmals davon Gebrauch gemacht, die stärkeren Bindungsstellen mit tRNA zu blockieren (s. 2.2.), um dann die schwächeren im hierfür optimalen Konzentrationsbereich zu untersuchen. Dadurch vereinfacht sich z.B. das Problem der Bestimmung der Bindungskonstanten der E-Stelle durch Blockierung der P- und A-Stelle auf die Analyse einer einzelnen Bindungsstelle. Einen ähnlichen Fall stellt die Titration der A-Stelle mit beladener tRNA^{Phe} dar, nachdem die P-Stelle mit tRNA blockiert worden ist. Die stärkeren Bindungsstellen schließlich wurden ebenfalls im optimalen Konzentrationsbereich studiert; die bei höherem tRNA-Überschuß mögliche Bindung in die A- und E-Stelle wurde bei der Auswertung der Titrationsdaten berücksichtigt (s.

Kap. 4.1.). Da hierzu die Bindungskonstanten der A- und E-Stelle nötig sind, werden die Titrationsen in der Reihenfolge E-, A- und P-Stelle dargestellt. Abschließend wird die Bestimmung der Affinitäten der P- und E-Stelle in Abwesenheit von mRNA beschrieben.

2.3.1. Bindung von deacylierter tRNA^{Phe} in die E-Stelle

Die ribosomale E-Stelle bindet spezifisch deacylierte tRNA^{Phe} und kann nach Blockierung der P- und A-Stelle separat untersucht werden. Wegen der Labilität dieser Bindung wurde in allen hier beschriebenen Gleichgewichtstitrationen die Menge gebundener tRNA durch die Fluoreszenztechnik bestimmt. Als Meßgröße wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität verschiedener tRNAs bei Bindung in die E-Stelle benutzt. So steigt die Quantenausbeute des Proflavinderivates der tRNA^{Phe} aus E. coli, tRNA^{Phe}_{Prf16/20}, bei der Bindung um 50%, die der tRNA^{Phe}_{Prf16/17} aus Hefe um 40%.

Das Vorgehen bei den Fluoreszenztitrationsen zeigt Abb. 14 am Beispiel der tRNA^{Phe}_{Prf16/17}. Poly(U)-programmierte Ribosomen, deren P- und A-Stellen mit einem 2.3fachen Überschuß an N-AcPhe-tRNA^{Phe} blockiert waren, wurden mit steigenden Mengen tRNA^{Phe}_{Prf16/17} versetzt und die Fluoreszenzintensität registriert. Im Parallelversuch wurde das Signal in Abwesenheit von Ribosomen aufgenommen. Die Signaländerung, die proportional zur Konzentration des tRNA-Ribosomen-Komplexes ist, wurde aus der Differenz der Komplex- und Referenztitration ermittelt (Abb. 14). Aus den so erhaltenen Titrationsdaten wurde die Bindungskonstante der E-Stelle durch nicht-lineare Anpassung berechnet (s. 4.1.3.). Die ausschließliche Bindung der tRNA^{Phe}_{Prf16/17} in die E-Stelle konnte übrigens dadurch gezeigt werden, daß nach Zugabe eines zehnfachen Über-

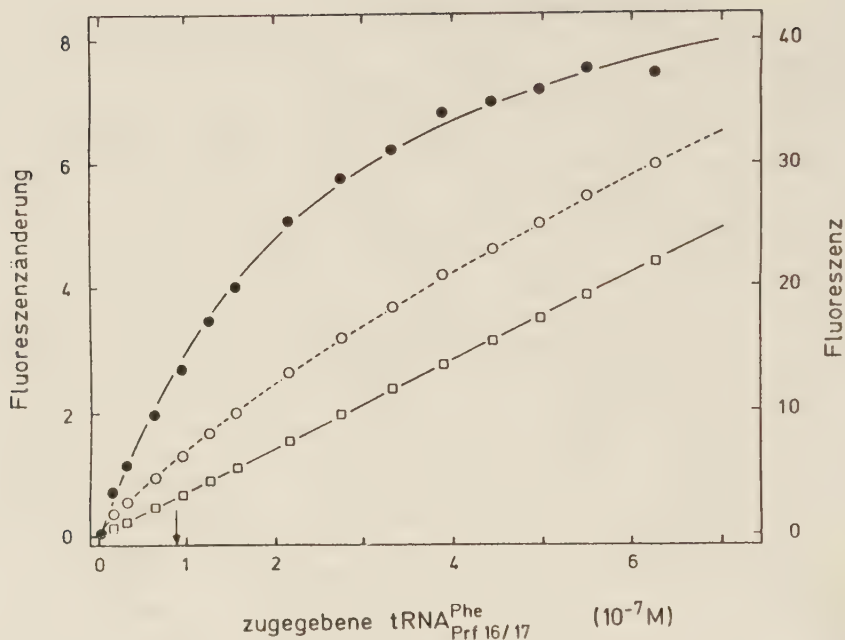


Abb. 14: Fluoreszenztitration der E-Stelle mit Proflavin-markierter tRNA^{Phe}_{Prf16/17} aus Hefe.

Die P- und A-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen (9.0×10^{-8} M; Pfeil) wurden in Puffer A (20 mM Mg^{2+}) mit einem 2.3fachen Überschuß an N-AcPhe-tRNA^{Phe} blockiert. Steigende Mengen tRNA^{Phe}_{Prf16/17} wurden zugegeben und das Fluoreszenzsignal (O) aufgezeichnet ("Komplextitration"). Die entsprechenden, in Abwesenheit von Ribosomen erhaltenen Fluoreszenzdaten (□, "Referenztitration") wurden durch lineare Regression geglättet und von den jeweiligen Daten der Komplextitration abgezogen. Aus den resultierenden Titrationsdaten (●) wurde die Bindungskonstante der E-Stelle (Tab. 2) durch nicht-lineare Regression bestimmt (s. 4.1.3.). Die durchgezogenen Linien stellen die Anpassungen dar. Das Fluoreszenzsignal wurde so normiert, daß 10 Einheiten der vollständigen Sättigung der E-Stelle entsprechen.

schaltet er nicht-fluoreszierender tRNA^{Phe} die Fluoreszenz-
empfindlichkeit innerhalb weniger Sekunden auf beinahe den Wert freier
tRNA^{Phe} Prof16/17 anfallt.

Affinitäts-Titrations wurden mit tRNA^{Phe} Prof16/20 (E. coli) vor-
genommen. In Abb. 15 ist zusätzlich zur Auswertung mit nicht-
linearer Anpassung die Auftragung nach Scatchard (1949) gezeigt.
Beide Auswertungsarten ergeben identische Resultate. Ein erheb-
licher Nachteil der Auswertung nach Scatchard liegt allerdings
darin, daß der Sättigungswert experimentell bestimmt werden muß.
Außerdem bedeutet die Linearisierung der Daten einen Informa-
tionsverlust gegenüber der nicht-linearen Analyse (Monson, 1988).
Deshalb wurde diese Auswertungsart normalerweise nicht verwendet.

Aus Abb. 15 wird deutlich, daß die Bindung desacylierter
tRNA^{Phe} in die E-Stelle bei Erniedrigung der Mg^{2+} -Konzentration
von 20 auf 10 mM schwächer wird. Die Zusammenstellung der bei
verschiedenen Ionenbedingungen erhaltenen Bindungskonstanten in
Tab. 2 (S. 46) zeigt, daß die Affinität für tRNA^{Phe} aus E. coli
um den Faktor acht und für tRNA^{Phe} aus Hefe um den Faktor vier ab-
nimmt. Aus Tab. 2 ist auch ein interessanter Unterschied zwischen
den Affinitäten der beiden tRNA^{Phe}s ersichtlichen. Unabhängig von
den Pufferbedingungen bindet die homologe tRNA^{Phe} vier- bis acht-
mal stärker in die E-Stelle als die heterologe (vgl. auch Abb. 14
und 16; s. 2.4.1.). Die geringere Affinität der tRNA^{Phe} aus Hefe
resultiert hauptsächlich aus einer höheren Geschwindigkeit der
Dissoziation aus der E-Stelle (2.2.2.). Dasselbe gilt für die ge-
ringere Affinitäten beider tRNA^{Phe}s bei 10 mM Mg^{2+} ; wie schon in
Abb. 7 gezeigt, ist die Bindung der tRNA^{Phe} aus Hefe in die E-
Stelle bei dieser Bedingung nicht durch Filterbindung nachzuwei-
sen, d.h. die tRNA dissoziiert während der Isolierung vom Ribosom.

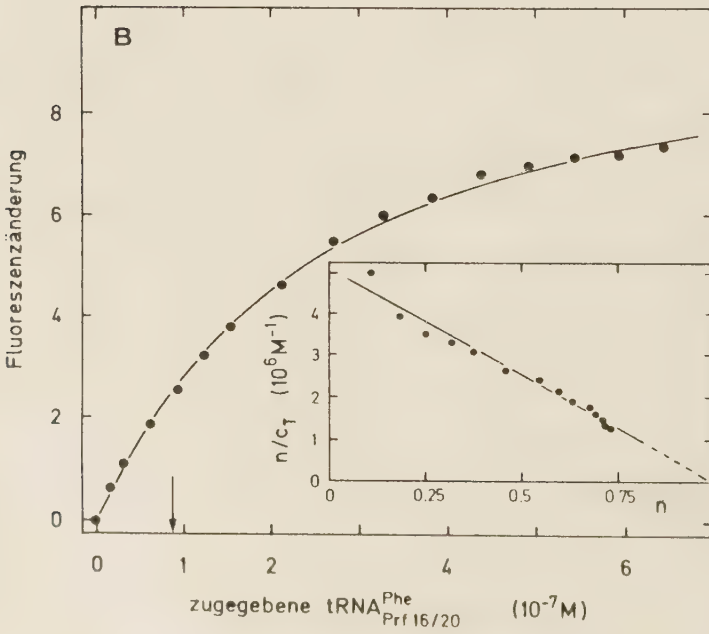
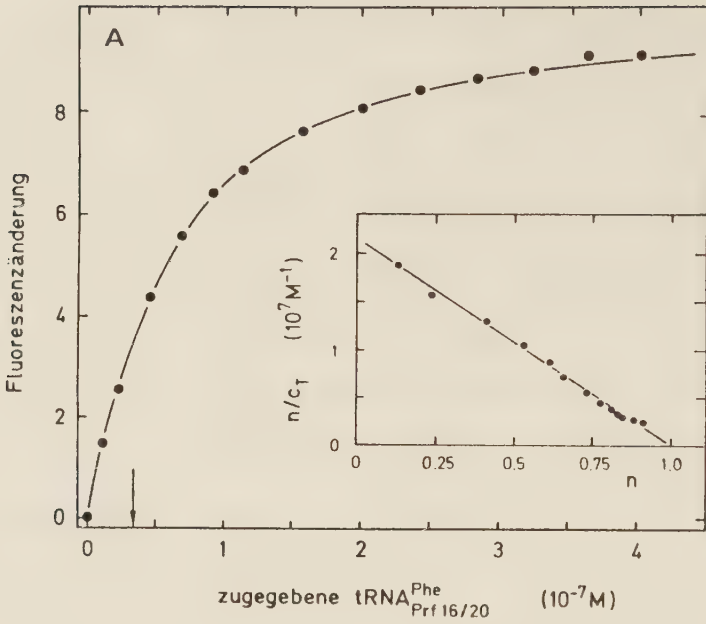


Abb. 15: Fluoreszenztitration der E-Stelle mit Proflavin-markierter tRNA^{Phe} Prf16/20 aus E. coli.

Die Titrationsen wurden bei A) 20 (Puffer A) und B) 10 mM Mg²⁺ (Puffer B) durchgeführt und die Daten ausgewertet wie in Abb. 14 beschrieben. Die Ribosomenkonzentration lag bei 3.4×10^{-8} M bzw. 8.8×10^{-8} M (Pfeile). Zusätzlich zu den Titrationsdaten ist die Auftragung nach Scatchard (1949) und die Auswertung dieser Daten durch lineare Regression (durchgezogene Linie) gezeigt (n: Verhältnis gebundener und freier tRNA; c_T: Konzentration an freier tRNA). Beide Auswertungsarten lieferten für die Bindungskonstante der E-Stelle (Tab. 2) identische Ergebnisse (s. auch Text).

Die Bindungskonstanten der E-Stelle sind unbeeinflusst durch Variationen der Ionenstärke (Tab. 2). Diese Eigenschaft ist neben der ausgeprägten Labilität der Bindung und der Spezifität für deacylierte tRNA^{Phe} charakteristisch für die E-Stelle, wodurch sich diese zusätzliche Bindungsstelle klar von der P- und A-Stelle unterscheidet.

2.3.2. Bindung von deacylierter tRNA^{Phe} und N-AcPhe-tRNA^{Phe} in die A-Stelle

Die Affinitäten der A-Stelle wurden für deacylierte tRNA^{Phe}, N-AcPhe-tRNA^{Phe} und Phe-tRNA^{Phe} bestimmt. Dazu wurden Ribosomen verwendet, deren P-Stelle mit unmarkierter tRNA^{Phe} blockiert war. Für die A-Stelle wurden keine Unterschiede zwischen homologer und heterologer tRNA beobachtet. Zunächst werden die Ergebnisse für deacylierte tRNA^{Phe} und N-AcPhe-tRNA^{Phe} beschrieben. Die Wechselwirkung mit Phe-tRNA^{Phe} sowie der Einfluß von EF-Tu und GTP auf die Bindungsstärke wird im nächsten Abschnitt behandelt.

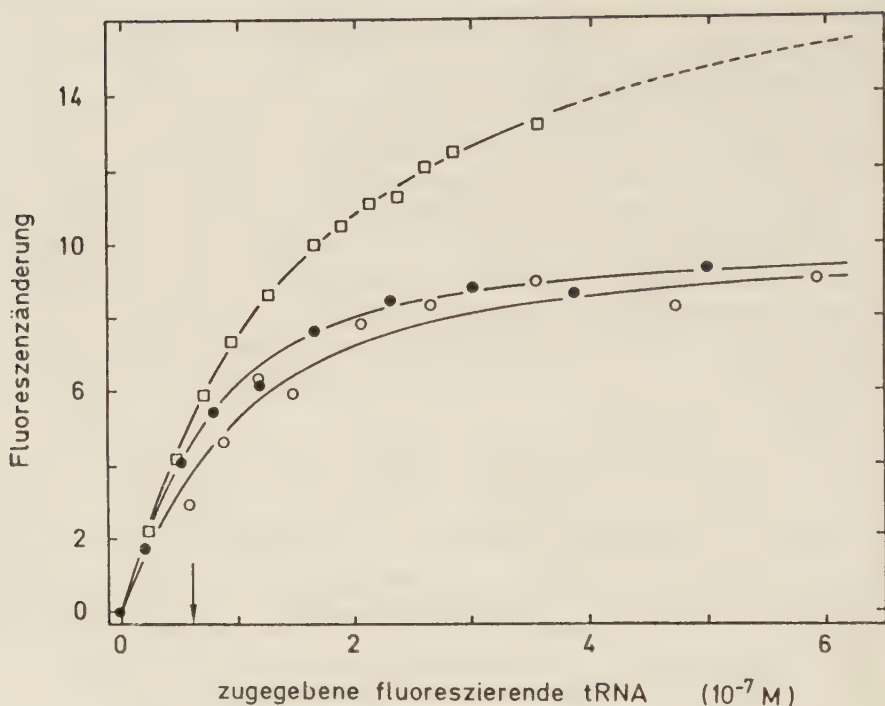


Abb. 16: Fluoreszenztitrationsen der A-Stelle mit deacylierter tRNA^{Phe} und N-AcPhe- tRNA^{Phe} .

Poly(U)-programmierte Ribosomen ($6.2 \times 10^{-8} \text{ M}$; Pfeil), deren P-Stelle mit tRNA^{Phe} aus *E. coli* blockiert war, wurden in Puffer A (20 mM Mg^{2+}) mit tRNA^{Phe} ($\square$), tRNA^{Phe} ($\circ$) oder N-AcPhe- tRNA^{Phe} ($\bullet$) titriert und die Änderung der Fluoreszenz des Proflavins bzw. des Wybutins (Kreise) wie in Abb. 14 ermittelt. 10 Einheiten auf der Ordinate entsprechen vollständiger Besetzung der A-Stelle. Die mit der Fluoreszenz des Wybutins verfolgten Titrationsen wurden mit dem Modell für eine einzelne Bindungsstelle ausgewertet (s. Text). Der zusätzliche Fluoreszenzeffekt bei Bindung von tRNA^{Phe} in die E-Stelle wurde durch eine Auswertung mit dem Modell für zwei Bindungsstellen berücksichtigt (s. 4.1.4.). Die resultierenden Bindungskonstanten sind aus Tab. 2 und 3 zu entnehmen.

Die Bindung von $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Prf16/17}}$ in die A-Stelle ist begleitet von einem Anstieg der Fluoreszenzintensität (Robertson & Wintermeyer, 1981). In ähnlicher Weise kann auch die Fluoreszenzänderung des natürlichen Fluorophors Wybutin in tRNA^{Phe} aus Hefe bei Bindung in die A-Stelle zur Untersuchung der tRNA-Ribosomen-Komplexe benutzt werden (Paulsen et al., 1982). Anders als bei der Untersuchung der P-Stelle stellt die geringe Quantenausbeute des Wybutins in diesem Fall keine Einschränkung dar, da die Komplexbildung wegen der deutlich geringeren Affinität der A-Stelle ohnehin bei relativ hohen Konzentrationen untersucht werden muß.

Beispiele für solche Titrationsen mit deacylierter tRNA^{Phe} und N-AcPhe-tRNA^{Phe} werden in Abb. 16 gezeigt. Für die Auswertung der Experimente ist es von Bedeutung, daß die Bindung von tRNA^{Phe} aus Hefe in die E-Stelle nicht mit einer Änderung der Fluoreszenz des Wybutins verbunden ist. Da mit dieser tRNA die Bindung in die E-Stelle erst nach der Besetzung der A-Stelle und unabhängig von dieser erfolgt (s. Abb. 6 und 4.1.1.), konnten die Daten ohne weitere Korrektur analog zur Titration mit N-AcPhe-tRNA^{Phe} unter Benutzung des Modells für eine Bindungsstelle ausgewertet werden. Mit $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Prf16/17}}$ jedoch führt die Bindung in die E-Stelle zu einem weiteren Fluoreszenzanstieg (s. 2.3.1.). Dem zusätzlichen Fluoreszenzeffekt (Abb. 16) wurde dadurch Rechnung getragen, daß der Besetzungsgrad der E-Stelle unter Benutzung der zuvor bestimmten Bindungskonstanten in die Auswertung der Daten einbezogen wurde. Der hierzu benötigte Formalismus ist im Abschnitt 4.1.4. erläutert. Der Korrekturfaktor q, der die unterschiedliche Fluoreszenzemission der tRNA in beiden Bindungsstellen angibt, wurde stöchiometrischen Titrationsen beider Bindungsstellen entnommen (o. Abb.). Unabhängig von den Ionenbedingungen wurde ein

Tab 2: Assoziationskonstanten der Bindung deacylierter tRNA^{Phe} aus E. coli und Hefe an Poly(U)-programmierte Ribosomen aus E. coli ^a

Puffer (mM Mg ²⁺)	P-Stelle (10 ⁸ M ⁻¹)	A-Stelle (10 ⁷ M ⁻¹)	E-Stelle	
			E. coli (10 ⁶ M ⁻¹)	Hefe (10 ⁶ M ⁻¹)
A (20)	1.8 ^{bc}	1.5 ^{bcde}	28 ^c	3.5 ^c
C (20)	7.0 ^c	8.0 ^{bcd}	43 ^c	5.0 ^c
A (10)	-	0.17 ^{bd}	3.5 ^c	0.9 ^c
B (10)	1.4 ^{bc}	0.5 ^{be}	5.0 ^c	1.3 ^c

^a Alle Messungen wurden mindestens dreimal bei verschiedenen Ribosomenkonzentrationen durchgeführt; der Fehler (Standardabweichung) ist geringer als $\pm 25\%$. Die Menge gebundener tRNA wurde mit verschiedenen Methoden bestimmt: ^b Filterbindungstechnik, ^c Proflavin-Fluoreszenz, ^d Wybutin-Fluoreszenz und ^e Indikatorbindungstest.

Wert von $q = 1.0 \pm 0.1$ gefunden. Mit beiden Meßgrößen, Wybutin- und Proflavinfluoreszenz, wurden identische Ergebnisse erhalten, d.h. die Einführung des Proflavins in die Dihydrouridinschleife der tRNA hat keinen Einfluß auf die Bindungseigenschaften der tRNA in die A-Stelle.

Wie schon gezeigt wurde, ist die tRNA-Bindung in die A-Stelle äußerst stabil; deshalb kann man die Komplexbildung auch mit der Filterbindungsmethode verfolgen, ohne an Meßgenauigkeit zu verlieren. Entsprechende Titrationsen wurden mit radioaktiv-

Tab 3: Assoziationskonstanten der Bindung beladener tRNA^{Phe} aus E. coli und Hefe an Poly(U)-programmierte Ribosomen aus E. coli ^a

Puffer (mM Mg ²⁺)	N-AcPhe-tRNA ^{Phe}		Phe-tRNA ^{Phe}
	P-Stelle (10 ⁹ M ⁻¹)	A-Stelle (10 ⁷ M ⁻¹)	A-Stelle (10 ⁷ M ⁻¹)
A (20)	0.6 ^b	3.0 ^{bcd}	20 ^b
C (20)	3.0 ^b	6.0 ^{bc}	100 ^b
A (10)	1.1 ^b	0.74 ^{bd}	1.0 ^b
B (10)	5.0 ^b	2.2 ^{bd}	2.0 ^b
B (6)	0.8 ^b	<0.2 ^b	-

^a Alle Messungen wurden mindestens dreimal bei verschiedenen Ribosomenkonzentrationen durchgeführt; der Fehler (Standardabweichung) ist geringer als +- 25%. Die Assoziationskonstanten der Bindung des ternären Komplexes Phe-tRNA^{Phe}·EF-Tu·GTP in die A-Stelle waren bei allen Pufferbedingungen größer als 10¹¹ M⁻¹ (^b). Die Menge gebundener tRNA wurde mit verschiedenen Methoden bestimmt: ^b Filterbindungstechnik, ^c Wybutin-Fluoreszenz und ^d Indikatorbindungstest.

markierter (³²P)tRNA^{Phe} und N-Ac(¹⁴C)Phe-tRNA^{Phe} durchgeführt (o. Abb.). Die Reaktionsansätze mit deacylierter tRNA^{Phe} wurden vor der Filtration verdünnt, um die Komplikation durch Besetzung der E-Stelle auszuschalten. Für beide tRNA-Arten war deshalb die Aus-

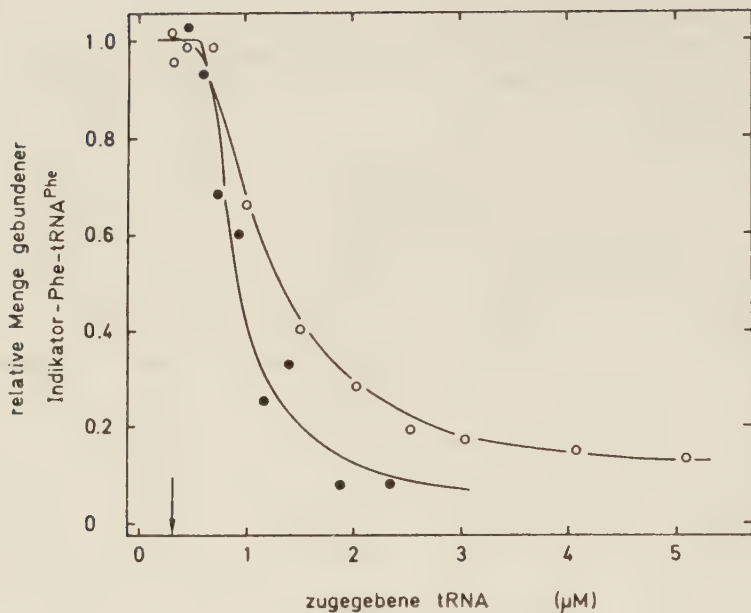


Abb. 17: Indikatorbindungstest zur Ermittlung der Affinität der A-Stelle für deacylierte tRNA^{Phe} und N-AcPhe-tRNA^{Phe}.

Poly(U)-programmierte Ribosomen (0.3 μM; Pfeil), deren P-Stelle blockiert war, wurden mit deacylierter tRNA^{Phe} aus Hefe (O) und N-AcPhe-tRNA^{Phe} (●; 10 Ci/mol) in Puffer B (10 mM Mg²⁺) zur Bindung in die A-Stelle 90 min inkubiert. Dann wurde der ternäre Komplex (¹⁴C)Phe-tRNA^{Phe}·EF-Tu·GTP (Endkonzentration 0.1 μM; 504 Ci/mol) zugegeben und der tRNA-Ribosomen-Komplex nach 30 s durch Nitrocellulosefiltration isoliert. Die Bindungskonstanten der A-Stelle (Tab. 2 und 3) wurden durch nicht-lineare Anpassung des in Kap. 4.2. beschriebenen Modells erhalten; die durchgezogenen Linien stellen die Anpassungen dar.

wertungsmethode für eine einzelne Bindungsstelle anwendbar. Im Rahmen der Fehlergrenzen wurden die gleichen Ergebnisse wie mit der Fluoreszenztechnik erhalten (Tab. 2 und 3).

Die sehr hohe Affinität des ternären Komplexes Phe-tRNA^{Phe}. EF-Tu·GTP für die ribosomale A-Stelle (s. 2.3.3.) erlaubte es, den oben beschriebenen Indikatorbindungstest auch zur Bestimmung der Bindungskonstanten der A-Stelle zu verwenden. Der besondere Vorteil dieser Methode liegt darin, daß die untersuchten tRNAs keine Markierung tragen müssen, da gebundene tRNA indirekt quantifiziert wird anhand der verminderten Bindung des im zweiten Inkubationsschritt zugegebenen ternären Komplexes. Die Bindungsstärke der A-Stelle für tRNA läßt sich aus der Steilheit der sigmoiden Titrationskurven ablesen (Abb. 17). Die Auswertung wurde durch nicht-lineare Anpassung des entsprechenden Bindungsmodells an die Daten erreicht (s. 4.2.3.) und bestätigte die Ergebnisse, die mit den beiden oben beschriebenen Methoden erhalten wurden.

Generell lassen sich für die Wechselwirkung mit der A-Stelle nur geringe Unterschiede zwischen den beiden tRNA-Arten feststellen (Tab. 2 und 3). So bindet bei allen untersuchten Ionenbedingungen N-AcPhe-tRNA^{Phe} etwas stärker als deacylierte tRNA^{Phe}, wobei bei 10 mM Mg²⁺ der Effekt deutlicher (vierfach) ist (Abb. 16 und 17). Der Einfluß der Ionenkonzentrationen auf die Stärke der Komplexbildung ist für beide tRNA-Arten ebenfalls ähnlich: Die Bindung wird schwächer durch Erniedrigung der Mg²⁺-Konzentration oder durch Erhöhung der Konzentration an monovalentem Salz.

2.3.3. Nicht-enzymatische und enzymatische Bindung von Phe-tRNA^{Phe} in die A-Stelle

Unter physiologischen Bedingungen wird die Bindung einer Aminoacyl-tRNA in die ribosomale A-Stelle durch den Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) katalysiert. Zur näheren Untersuchung des

stimulierenden Einflusses des Enzyms wurden die Affinitäten von Phe-tRNA^{Phe} für die A-Stelle in Abwesenheit und Gegenwart von EF-Tu·GTP bestimmt. Da die Bindung - ähnlich wie die von N-AcPhe-tRNA^{Phe} - sehr stabil ist, konnte die Komplexbildung mit der Filtrationstechnik verfolgt werden. Wegen der Notwendigkeit sehr geringer Konzentrationen zur Untersuchung der hohen Bindungsstärke in Gegenwart von EF-Tu erwies sich diese Methode als die am besten geeignete.

Unter nicht-enzymatischen Bedingungen ist die Bindung von Phe-tRNA^{Phe} in die A-Stelle recht langsam (s. 2.2.1.). Um eine Hydrolyse der Aminosäure während der Inkubation zu vermeiden, wurden solche Titrationen in Gegenwart von Phenylalanyl-tRNA-Ligase, (¹⁴C)Phenylalanin und ATP ("in situ" Aminoacylierung; s. 5.2.1.) durchgeführt. Zur enzymatischen Bindung hingegen wurde gereinigte (¹⁴C)Phe-tRNA^{Phe} verwendet und die aktuelle Konzentration mit der TCA-Fällung bestimmt. Beispiele für solche Experimente sind in Abb. 18 für 10 und 20 mM Mg²⁺-Konzentration gezeigt.

Wie aus der Zusammenfassung der bei verschiedenen Pufferbedingungen erhaltenen Ergebnisse in Tab. 3 hervorgeht, bindet Phe-tRNA^{Phe} bei 20 mM Mg²⁺ zehnmal stärker als N-AcPhe-tRNA^{Phe} in die A-Stelle, während bei 10 mM Mg²⁺ praktisch gleiche Affinitäten erhalten wurden. Wegen der sehr ähnlichen A-Stellenbindung von deacylierter tRNA^{Phe} und N-AcPhe-tRNA^{Phe} (s. 2.3.2.) gilt diese Aussage auch für den Vergleich zwischen Phe-tRNA^{Phe} und deacylierter tRNA^{Phe}. Zumindest bei niedrigeren Mg²⁺-Konzentrationen binden also alle drei tRNA-Arten mit ähnlichen Affinitäten in die A-Stelle, d.h. die Daten lieferten keinen Hinweis für die

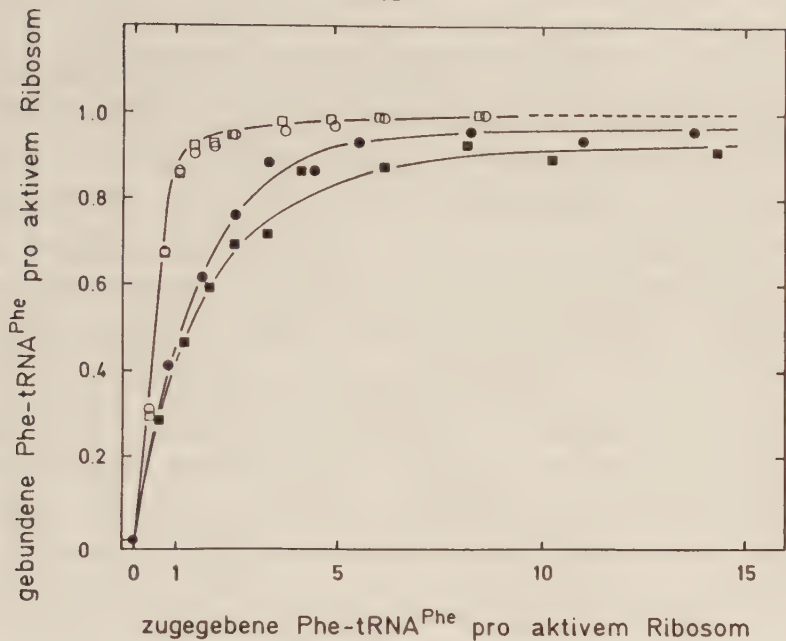


Abb. 18: Einfluß des Elongationsfaktors Tu auf die Bindungsstärke von Phe-tRNA^{Phe} in die A-Stelle.

Die Titrationen Poly(U)-programmierter Ribosomen, deren P-Stelle mit deacylierter tRNA^{Phe} blockiert war, wurden mit (¹⁴C)Phe-tRNA^{Phe} (geschlossene Symbole) oder (¹⁴C)Phe-tRNA^{Phe}. EF-Tu·GTP (offene Symbole) in Puffer A (20 mM Mg²⁺; Kreise) und Puffer B (10 mM Mg²⁺; Quadrate) durchgeführt. Zur nicht-enzymatischen Bindung wurde tRNA^{Phe} "in situ" aminoacyliert (s. 5.2.1.). Gebundene Phe-tRNA^{Phe} wurde mit dem Filterbindungstest bestimmt und die Daten mit dem Modell für eine Bindungsstelle ausgewertet (Tab. 3); die durchgezogenen Linien stellen die Anpassungen dar. Den Abszissen- und Ordinatenwerten ist eine Ribosomenaktivität von 65% zugrunde gelegt. In Abwesenheit von EF-Tu betrug die Ribosomenkonzentration 1.0×10^{-8} M (Puffer A) und 6.0×10^{-8} M (Puffer B), in Gegenwart des Enzyms 6.7×10^{-10} M für beide Pufferbedingungen.

Existenz einer besonders stark bindenden Konformation der Phe-tRNA^{Phe}, wie dies früher berichtet worden war (Kirillov et al., 1978; Kirillov & Odinzov, 1978).

Für die Bindung des ternären Komplexes $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}} \cdot \text{EF-Tu} \cdot \text{GTP}$ wurde eine sehr hohe Affinität in der A-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen gefunden. Wie aus der Abb. 18 ersichtlich ist, weicht die Titrationskurve auch bei sehr niedrigen Ribosomenkonzentrationen nicht ab von einer stöchiometrischen Aufnahme der $(^{14}\text{C})\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$. Aus den bei den tiefsten Ribosomenkonzentrationen (0.1 nM) durchgeführten Experimenten läßt sich abschätzen, daß zwischen 6 und 20 mM Mg^{2+} die Affinitäten größer als 10^{11} M^{-1} sind. Die deutlich höhere Affinität im Vergleich zur nicht-enzymatischen Bindung von $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ ist allerdings nicht ohne weiteres ein Hinweis auf die stärkere Bindung des ternären Komplexes selbst, da die nachfolgende GTP-Hydrolyse zu einer Verschiebung des Bindungsgleichgewichts in Richtung des Komplexes führt (s. 3.1.).

2.3.4. Bindung von deacylierter tRNA^{Phe} und $\text{N-AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ in die P-Stelle

Die P-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen wird als erste Bindungsstelle mit tRNA gefüllt. Während der Titration der P-Stelle mit deacylierter tRNA^{Phe} und $\text{N-AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ wird jedoch zumindest bei höherem tRNA-Überschuß auch die A- (und E-)Stelle besetzt. Diese zusätzliche, nicht in der P-Stelle gebundene tRNA-Menge wurde mit Hilfe der zuvor bestimmten Bindungskonstanten der A- (und E-)Stelle berechnet und in die Auswertung der Titrationsdaten einbezogen. Die dazu nötigen Formalismen werden in Kap. 4.1. näher erläutert.

Neben der Nitrocellulosefiltration mit $(^{32}\text{P})\text{tRNA}^{\text{Phe}}$ und N-Ac(^{14}C)Phe-tRNA $^{\text{Phe}}$ erwies sich die Messung der Fluoreszenz des Proflavins in tRNA $^{\text{Phe}}_{\text{Prf16/17}}$ (Robertson & Wintermeyer, 1981) als genügend empfindliche Methode zur Bestimmung gebundener tRNA. Die Intensitätsfaktoren q_1 und q_2 , welche die unterschiedlichen Quantenausbeuten fluoreszierender tRNA in den verschiedenen Bindungsstellen berücksichtigen (s. 4.1.5.), wurden in separaten, stöchiometrischen Titrationsbestimmungen (o. Abb.); für q_1 und q_2 wurden Werte von 0.9 ± 0.1 und 1.4 ± 0.2 erhalten. In Abb. 19 sind Beispiele für die beiden Bestimmungsmethoden dargestellt; zur Auswertung der Bindungskonstanten der P-Stelle wurden die entsprechenden Formalismen aus Kap. 4.1. benutzt. Die zusätzliche Bindung in die A- (und E-)Stelle ist in Abb. 19 ersichtlich aus der Differenz zwischen den Titrationskurven und den gestrichelten Linien, die für die tatsächliche Besetzung der P-Stelle berechnet wurden. Bei Titrationsbestimmungen mit deacylierter $(^{32}\text{P})\text{tRNA}^{\text{Phe}}$ (o. Abb.) wurden die Reaktionsansätze vor der Filtration verdünnt, um die Bindung in die E-Stelle vernachlässigen zu können. Die so erhaltenen Titrationskurven wurden deshalb mit dem Modell für zwei Bindungsstellen ausgewertet.

Wie bei den Titrationsbestimmungen der A-Stelle waren die Ergebnisse unabhängig von der benutzten Meßmethode; ebenso wurden für tRNAs aus *E. coli* und aus Hefe identische Resultate erzielt (Tab. 2 und 3). Die Bindungskonstanten der P-Stelle waren mindestens zehnmal größer als die der A-Stelle. Unter nicht-enzymatischen Bedingungen ist die P-Stelle also die stärkste tRNA-Bindungsstelle des Ribosoms und wird daher bevorzugt mit tRNA besetzt. Vergleicht man die Affinitäten der P-Stelle für deacylierte tRNA $^{\text{Phe}}$ und N-AcPhe-tRNA $^{\text{Phe}}$ (s. auch Abb. 19), so unterscheiden sie sich deut-

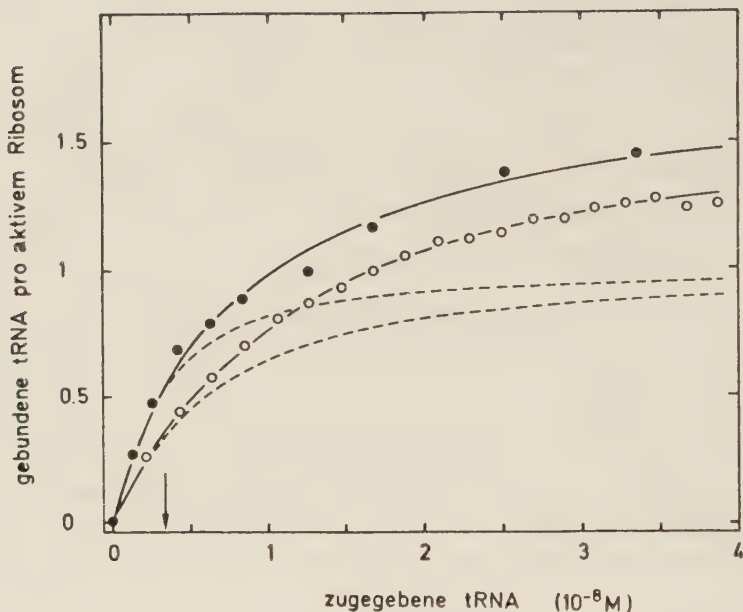


Abb. 19: Gleichgewichtstitrationen der P-Stelle mit N-AcPhe-tRNA^{Phe} und deacylierter tRNA^{Phe}.

Unbesetzte, Poly(U)-programmierte Ribosomen (3.0×10^{-9} M; Pfeil) wurden mit steigenden Mengen N-Ac(14 C)Phe-tRNA^{Phe} (●) oder deacylierter tRNA^{Phe}_{Prf16/17} (O) in Puffer A (20 mM Mg²⁺) versetzt; wie in Abb. 18 bzw. 14 beschrieben wurde die Komplexbildung durch Filterbindung oder Fluoreszenzmessung verfolgt. Zur Berücksichtigung der zusätzlichen Bindung in die A- (und E-)Stelle wurden die Daten mit den Modellen für zwei bzw. drei Bindungsstellen durch nicht-lineare Regression (durchgezogene Linien; Tab. 2 und 3) ausgewertet (s. Kap. 4.1.). Die Parameter der Anpassung wurden dazu benutzt, die Besetzung der P-Stelle alleine zu illustrieren (gestrichelte Linien).

licher als dies für die A-Stelle beobachtet wurde. Am ausgeprägtesten ist dieser Effekt bei 10 mM Mg²⁺; interessanterweise steigt nämlich die Bindungsstärke der N-AcPhe-tRNA^{Phe} bei Erniedrigung der Mg²⁺-Konzentration von 20 auf 10 mM an. Im Gegensatz

dazu wird deacylierte tRNA^{Phe} bei niedrigerer Mg^{2+} -Konzentration deutlich schwächer gebunden. In ähnlicher Weise ergab sich auch für die beiden anderen tRNA-Bindungsstellen bei niedrigerer Mg^{2+} -Konzentration eine geringere Affinität. Für die Abhängigkeit der Bindungskonstanten von der Ionenstärke findet man allerdings für die P-Stelle dasselbe Verhalten wie für die A-Stelle, d.h. eine Abnahme der Bindungsstärke bei Erhöhung der Ionenstärke.

2.3.5. Zahl der ionischen Wechselwirkungen bei der tRNA-Bindung in die P-Stelle

Um den Einfluß der Ionenstärke über einen größeren Bereich zu untersuchen, wurden Salztitrationen für die Bindung von deacylierter tRNA^{Phe} und $\text{N-AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ in die P-Stelle bei einem konstanten tRNA/Ribosomen-Verhältnis durchgeführt. Eine Veränderung der Affinität der P-Stelle ist am unterschiedlichen Ausmaß der Komplexbildung abzulesen. Die größte Meßempfindlichkeit wird erzielt, wenn bei einer mittleren Salzkonzentration die Komplexpartner in Konzentrationen nahe der Dissoziationskonstanten vorliegen. In Abb. 20 wurde bei 10 mM Mg^{2+} die Konzentration an NH_4Cl variiert und die Komplexbildung mit der Fluoreszenztechnik ($\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Prf16/17}}$) oder dem Filterbindungstest ($\text{N-Ac}^{(14)\text{C}}\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$) verfolgt. Mit beiden tRNA-Arten wurden glockenförmige Kurven mit einem Bindungsmaximum bei 25 mM NH_4Cl erhalten. Bei 20 mM Mg^{2+} liegt das Maximum bei 35 mM NH_4Cl (o. Abb.).

Aus den Daten in Abb. 20 läßt sich die Zahl der ionischen Wechselwirkungen der tRNA-Bindung in die P-Stelle bestimmen. Ein allgemeines Auswertungsverfahren wurde von Record et al. (1976; 1978) für die Bindung von Proteinen an DNA oder RNA beschrieben.

Es beinhaltet eine Linearisierung der Daten durch eine Auftragung von $\log(K)$ gegen $-\log(c_{M^+})$ (s. Einschub in Abb. 20). Unter der Annahme, daß während des Bindungsprozesses keine Anionen ver-

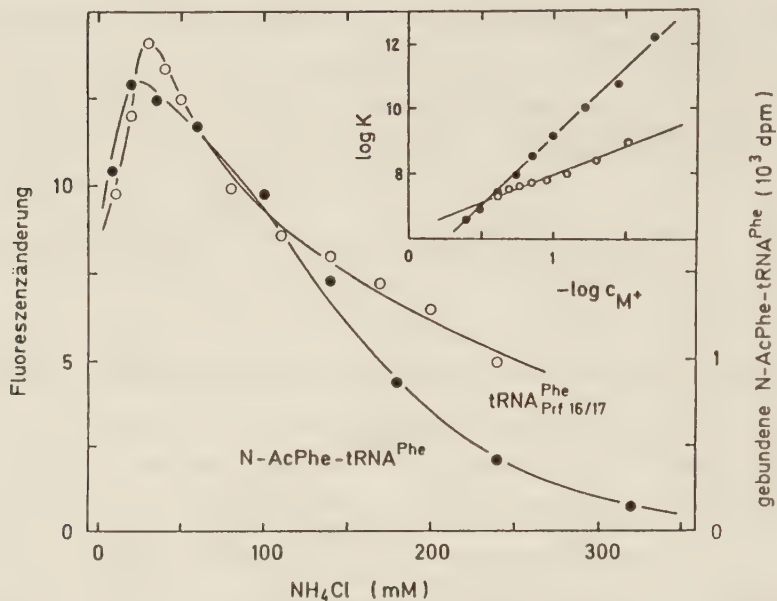


Abb. 20: Einfluß der Ionenstärke auf die Affinität der P-Stelle.

Poly(U)-programmierte Ribosomen (1.0×10^{-8} M) wurden in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM Mg(OAc)₂, 1 mM Dithioerythrit und einer variablen Konzentration an NH₄Cl inkubiert mit einer äquimolaren Menge an N-Ac(¹⁴C)Phe-tRNA^{Phe} oder tRNA^{Phe} Prf16/17. Nach 30 min wurde die Komplexbildung durch Nitrocellulosefiltration oder Messung der Proflavinfluoreszenz bestimmt; die jeweiligen Blindwerte in Abwesenheit von Ribosomen wurden abgezogen. Zur Ermittlung der Zahl der Ionenbindungen, die bei der tRNA-Bindung in die P-Stelle aufgebaut werden, wurden die Daten nach Record et al. (1976) doppelt-logarithmisch aufgetragen (Einschub). Das zur Berechnung von $\log(K)$ benötigte Signal bei maximaler Bindung wurde entweder durch TCA-Fällung der N-AcPhe-tRNA^{Phe} gemessen oder aus der Fluoreszenz von tRNA^{Phe} Prf16/17 in Gegenwart eines Überschusses an Ribosomen bestimmt.

drängt werden, kann aus der Steigung der erhaltenen Geraden die Zahl der ionischen Wechselwirkungen und aus dem Ordinatenabschnitt der nicht-ionische Beitrag zur Bindungsstärke abgelesen werden. Für $\text{tRNA}_{\text{Prf16/17}}^{\text{Phe}}$ wurden 2.1 bzw. 2.6 Ionenpaare berechnet, je nachdem ob eine Bindung ausschließlich doppelsträngiger oder einzelsträngiger Bereiche der tRNA angenommen wurde. Für $\text{N-AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ ergaben sich entsprechend 4.7 und 6.0 Ionenpaare. Bei der Bindung der beiden tRNA-Arten in die P-Stelle werden damit mindestens drei bzw. fünf Ionenbindungen aufgebaut. Den größeren Beitrag zur Gesamtbindungsstärke in der P-Stelle liefern allerdings die nicht-ionischen Bindungskräfte, die für deacylierte $\text{tRNA}_{\text{Prf16/17}}^{\text{Phe}}$ und $\text{N-AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ Werte von 10^6 M^{-1} und 10^5 M^{-1} ergaben. Das qualitativ zwar recht ähnliche, quantitativ aber unterschiedliche Verhalten der beiden tRNA-Arten deutet - auch unter Berücksichtigung der zusätzlichen, positiven Ladung am Proflavin (Wintermeyer & Zachau, 1975; 1979) - darauf hin, daß unterschiedliche Bereiche der tRNAs mit der P-Stelle in Wechselwirkung treten.

2.3.6. Affinitäten der tRNA-Bindung in Abwesenheit von mRNA

Der Einfluß der Codon-Anticodon-Wechselwirkung auf die Stärke der tRNA-Bindung ist für die drei tRNA-Bindungsstellen des Ribosoms sehr verschieden. So ließ sich in Abwesenheit von mRNA eine Bindung in die A-Stelle weder mit dem Filterbindungstest nachweisen noch mit der Fluoreszenzmethode, die auch labile Komplexe erfassen würde. Unter Berücksichtigung der Empfindlichkeit der Nachweismethoden läßt sich abschätzen, daß die mRNA-abhängige tRNA-Bindung in die A-Stelle eine Bindungskonstante unter 10^5 M^{-1}

haben muß. Dies bedeutet, daß die nicht-enzymatische Bindung in die A-Stelle mindestens um den Faktor 100 schwächer ist als die Bindung in Gegenwart von Poly(U).

Auch in Gegenwart von EF-Tu*GTP wurde keine signifikante Komplexbildung beobachtet, d.h. auch unter enzymatischen Bedingungen ist die Bindung schwächer als 10^5 M^{-1} . Die einzige hierzu vergleichbare Messung in der Literatur wurde mit Leu-tRNA₂^{Leu} vorgenommen (Thompson & Karim, 1982). Die Affinität der Bindung dieser tRNA im Komplex mit EF-Tu*GTP an Poly(U)-programmierte Ribosomen wurde aus den Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion zu maximal $6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ bestimmt. Beim Vergleich der beiden Zahlen ist zu berücksichtigen, daß tRNA₂^{Leu} (Anticodon GAG) mit einem UUU-Triplett, entsprechend der "wobble"-Hypothese (Crick, 1966), noch zwei Basenpaare ausbilden kann, gegenüber den dreien, die tRNA^{Phe} (Anticodon GAA) ausbildet.

Die Affinitäten der Bindung von N-AcPhe-tRNA^{Phe} in die P-Stelle unprogrammierter Ribosomen wurde mit der Filterbindungsmethode und der Fluoreszenzemission des Wybutins bestimmt (o. Abb.). Die Titrations wurden mit dem Modell für eine Bindungsstelle ausgewertet und die Ergebnisse für verschiedene Ionenbedingungen in Tab. 4 zusammengefaßt. Das Fehlen eines passenden Codons macht sich in einer Abnahme der Bindungsstärke der N-AcPhe-tRNA^{Phe} in der P-Stelle um mehr als zwei Größenordnungen bemerkbar (vgl. Tab. 3 und 4). Wie im Kapitel 2.2. und in Tab. 1 gezeigt wurde, resultiert die starke Abnahme der Affinität sowohl aus einer langsameren Hinreaktion als auch aus einer erhöhten Geschwindigkeit der Dissoziation aus der P-Stelle.

Tab. 4: Assoziationskonstanten der Bindung deacylierter tRNA^{Phe} und N-AcPhe-tRNA^{Phe} aus E. coli und Hefe an Ribosomen aus E. coli in Abwesenheit von mRNA^a

Puffer (mM Mg ²⁺)	deacylierte tRNA ^{Phe}			N-AcPhe-tRNA ^{Phe}		
	Stöchiometrische		Stellenspezif. Bestimmungsmethode	Stellenspezif.		Stellenspezif.
	K ₁	K ₂ Hefe		E-Stelle E. coli	Hefe	P-Stelle
A (20)	5.0 ^c	1.6 ^c	2.8 ^c	7.5 ^c	2.5 ^c	6.0 ^{de}
C (20)	11.0 ^c	3.0 ^c	5.7 ^c	-	3.0 ^c	13.0 ^{de}
B (15)	2.8 ^c	0.85 ^c	1.5 ^c	-	1.2 ^c	-
B (10)	-	-	-	-	-	0.7 ^{de}

^a Sämtliche Daten sind in Einheiten von 10⁶ M⁻¹ angegeben. Alle Messungen wurden mindestens dreimal bei verschiedenen Ribosomenkonzentrationen durchgeführt; der Fehler (Standardabweichung) ist geringer als +- 40%. ^b Stellenspezifische Bindungskonstante für die P- und E-Stelle; die Zahlen wurden berechnet unter der Annahme identischer Bindungsstellen ohne Wechselwirkung (s. Text). Die Menge gebundener tRNA wurde mit verschiedenen Methoden bestimmt: ^c Proflavin-Fluoreszenz, ^d Wybutin-Fluoreszenz und ^e Filterbindungstechnik.

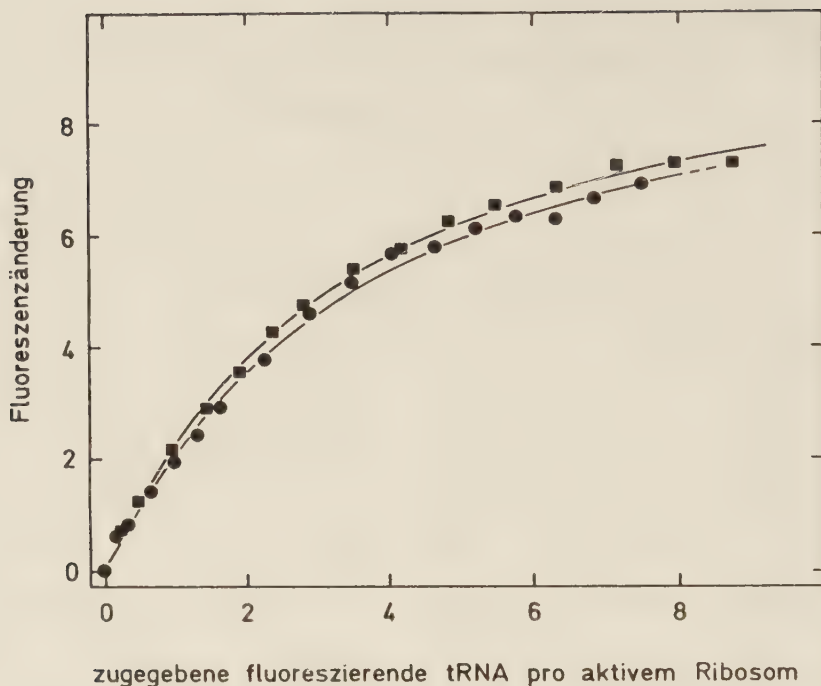


Abb. 21: Fluoreszenztitrationen zur Bestimmung der stellenspezifischen Bindungskonstanten der E-Stelle in Abwesenheit von mRNA.

Die Titrationen mit $\text{tRNA}_{\text{Prf16/20}}^{\text{Phe}}$ aus *E. coli* (■) und $\text{tRNA}_{\text{Prf16/17}}^{\text{Phe}}$ aus Hefe (●) wurden wie in Abb. 14 durchgeführt. Im Unterschied dazu war die P-Stelle der unprogrammierten Ribosomen (Endkonzentrationen 4.8×10^{-8} M bzw. 1.2×10^{-7} M) mit einem dreifachen Überschuß an $\text{N-AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ blockiert (s. 5.2.1.), wodurch die P-Stelle zu 85% besetzt war. Die Auswertung der Titrationen (Tab. 4) wurde durch Anpassung des Modells für eine Bindungsstelle vorgenommen (durchgezogene Linien). Die Ordinate ist normiert wie in Abb. 14.

Deacylierte tRNA^{Phe} bindet in Abwesenheit von mRNA nicht in einer bestimmten Reihenfolge in die P- und E-Stelle. Dennoch ist es möglich, die stellenspezifische Bindungskonstante der E-Stelle separat zu ermitteln. Die Stabilität der Bindung von N-AcPhe- tRNA^{Phe} reicht nämlich auch in Abwesenheit von Poly(U) aus, um die P-Stelle zu blockieren. Um die Blockierung effizient genug zu machen, wurde N-AcPhe- tRNA^{Phe} in dreifachem Überschuß zu Ribosomen gegeben (s. Abb. 8). Fluoreszenztitrationen der E-Stelle wurden mit $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Prf16/20}}$ (E. coli) und $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Prf16/17}}$ (Hefe) durchgeführt (Abb. 21). Der Vergleich der Ergebnisse in Tab. 4 mit den Daten in Anwesenheit von Poly(U) (Tab. 2) zeigt einen nur geringen Einfluß des passenden Codons auf die Bindungsstärke in der E-Stelle.

Im Gegensatz zur E-Stelle kann die Affinität der P-Stelle nicht separat untersucht werden. Da in Abwesenheit von mRNA kein sequentielles Bindungsverhalten - wie im Falle Poly(U)-programmierter Ribosomen - beobachtet wurde, ist nur ein allgemeiner Ansatz durchführbar: die Bestimmung sog. stöchiometrischer Bindungskonstanten aus der gleichzeitigen Titration beider Bindungsstellen (Klotz, 1974). Die Titrationen wurden wie oben beschrieben durchgeführt und das in Abschnitt 4.1.6. dargelegte Modell zur Auswertung der stöchiometrischen Bindungskonstanten, K_1 und K_2 , benutzt (Klotz & Hunston, 1975). Abb. 22 zeigt eine solche Titration mit $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Prf16/17}}$ aus Hefe.

Bei allen untersuchten Pufferbedingungen unterscheiden sich K_1 und K_2 ungefähr vierfach (Tab. 4); dieses Verhältnis ist - aus statistischen Gründen (Klotz & Hunston, 1979; Cantor & Schimmel, 1980) - für zwei identische Bindungsstellen zu erwarten, zwischen denen keinerlei Wechselwirkung besteht. Offenbar besitzen die

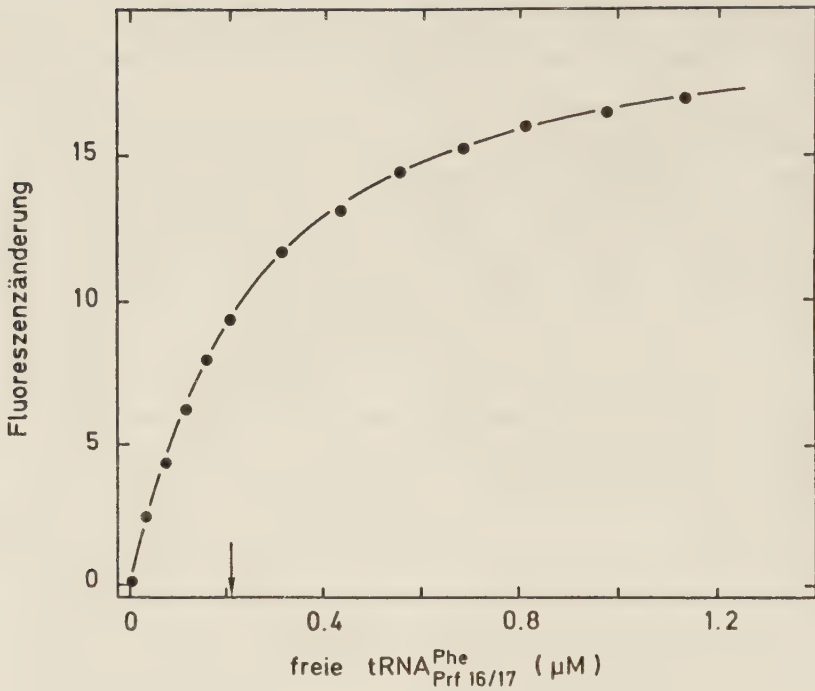


Abb. 22: Fluoreszenztitration zur Bestimmung der stöchiometrischen Bindungskonstanten der P- und E-Stelle in Abwesenheit von mRNA.

Unbesetzte Ribosomen (2.1×10^{-7} M; Pfeil) wurden wie in Abb. 14 mit tRNA^{Phe}_{Prf16/17} titriert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Modell zur Bestimmung stöchiometrischer Bindungskonstanten; die Abszisse gibt die Konzentration freier tRNA^{Phe}_{Prf16/17} an (s. 4.1.6.). Die Ordinate ist entsprechend Abb. 16 normiert.

nicht-programmierte P- und E-Stelle gleiche Affinitäten für deacylierte tRNA^{Phe} ; diese stellenspezifischen Daten (K in Tab. 4) lassen sich aus K_1 und K_2 errechnen (s. 4.1.6.). Für die E-Stelle stimmen die Ergebnisse recht gut überein mit den aus der stellenspezifischen Bestimmungsmethode erhaltenen Bindungskonstanten, d.h. die beiden Ansätze liefern konsistente Resultate.

Aus der Zusammenfassung der Daten in Tab. 4 wird deutlich, daß die Anwesenheit des passenden Codons die Bindungsstärke deacylierter tRNA^{Phe} in der ribosomalen E-Stelle kaum erhöht. Diese Beobachtung gilt sowohl für die homologe tRNA^{Phe} , die in Gegenwart von Poly(U) viermal stärker in die E-Stelle bindet als ohne mRNA, als auch für die schwächer bindende tRNA^{Phe} aus Hefe, für die kein Unterschied gefunden wurde. Diese Ergebnisse schließen zwar eine Codon-Anticodon-Wechselwirkung in der E-Stelle nicht aus, doch dürfte sie zumindest sehr schwach sein.

Der geringe Einfluß der mRNA auf die Bindungsstärke der E-Stelle ist besonders eindrucksvoll im Vergleich zur P- und A-Stelle. So wurde z.B. für die programmierte P-Stelle sowohl mit deacylierter tRNA^{Phe} als auch mit N-AcPhe- tRNA^{Phe} eine Zunahme der Affinität um mindestens zwei Größenordnungen beobachtet. Frühere, qualitative Berichte, welche die Existenz einer Codon-Anticodon-Wechselwirkung in der P-Stelle darlegten, werden dadurch bestätigt (Robertson et al., 1977; Lührmann et al., 1979; Peters & Yarus, 1979; Wurmbach & Nierhaus, 1979).

2.4. Bindung falsch-kodierter tRNAs in die E-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen

In den vorhergehenden Kapiteln wurde gezeigt, daß die ribosomale E-Stelle sich in einer Reihe von Eigenschaften von der P- und A-Stelle unterscheidet. Ein wesentlicher Punkt - auch hinsichtlich der funktionellen Bedeutung dieser Bindungsstelle - ist die weitgehende mRNA-Unabhängigkeit der tRNA-Bindung; so wurden in An- und Abwesenheit von Poly(U) nahezu identische Affinitäten für tRNA^{Phe} beobachtet (vgl. Tab. 2 und 4). Aus diesen Daten war zu erwarten, daß auch falsch-kodierte tRNAs, also tRNAs ohne ein zum Codon komplementäres Anticodon, effizient in die E-Stelle binden.

In diesem Kapitel sollen die bisherigen Experimente im tRNA^{Phe}-Poly(U)-System ausgedehnt werden auf die Bindung verschiedener falsch-kodierter tRNAs in die E-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen. Wegen der ausgeprägten Labilität der tRNA-Bindung in die E-Stelle erschien der direkte Nachweis der Bindung, z.B. mit Nitrocellulosefiltration und radioaktiv-markierten tRNAs, jedoch als ungeeignet. Deshalb wurden für solche Untersuchungen ausschließlich Gleichgewichtsmethoden verwendet, und die Besetzung der E-Stelle mit falsch-kodierten tRNAs indirekt am Bindungsverhalten der tRNA^{Phe} abgelesen, was im übrigen den Vorteil hatte, daß unmarkierte tRNAs benutzt werden konnten. Als geeignete Methode erwies sich zum einen die Indikator-titration der A-Stelle mit tRNA^{Phe} aus E. coli, da eine Besetzung der E-Stelle in diesem Test indirekt ersichtlich wird aus der Stöchiometrie, mit der die A-Stelle mit tRNA^{Phe} gefüllt wird. Zum anderen wurden Fluoreszenzmessungen mit tRNA^{Phe} durchgeführt

Prf16/20

und die kompetitive Bindung falsch-kodierter tRNAs in die E-Stelle nachgewiesen durch ein relativ zur freien E-Stelle geringeres Fluoreszenzsignal.

2.4.1. Indirekter Nachweis der Besetzung der E-Stelle durch den Indikatorbindungstest der A-Stelle

Mit dem Indikatorbindungstest der A-Stelle wird die tRNA-Besetzung dieser Bindungsstelle abgelesen aus dem restlichen Bindungsvermögen des in einem zweiten Inkubationsschritt zugegebenen ternären Komplexes $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}} \cdot \text{EF-Tu} \cdot \text{GTP}$ (s. 2.1.1.). Wird die Titration mit deacylierter tRNA^{Phe} aus *E. coli* und Ribosomen mit blockierter P-Stelle durchgeführt, so wird die A-Stelle mit einer Stöchiometrie von zwei gefüllt, da zuvor (oder gleichzeitig) die E-Stelle mit tRNA^{Phe} besetzt wird (s. 2.1.3.). Ist die E-Stelle bereits besetzt, z.B. mit einer falsch-kodierten tRNA, so wird die A-Stelle, die ja wegen der absoluten Codonspezifität nur die "passende" tRNA^{Phe} bindet, mit einer Stöchiometrie von eins gesättigt. Man kann somit die Besetzung der E-Stelle indirekt ablesen aus der Stöchiometrie, mit der die A-Stelle mit tRNA^{Phe} aus *E. coli* gefüllt wird. Da die Bindung in die A-Stelle sehr stabil ist (s. 2.2.2.), kann der Test - auch hinsichtlich der Aussage über die E-Stelle - als Gleichgewichtsmethode betrachtet werden.

Indikatortitrationen nach diesem experimentellen Ansatz zeigt Abb. 23. Steigende Mengen an tRNA^{Phe} aus *E. coli* wurden in Puffer A (20 mM Mg^{2+}) zusammen mit der falsch-kodierten $\text{tRNA}_3^{\text{Arg}}$ aus Hefe zu Poly(U)-programmierten Ribosomen, deren P-Stelle blockiert war, gegeben und die Besetzung der A-Stelle mit $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}} \cdot \text{EF-Tu} \cdot \text{GTP}$ getestet. Bei einem 20fachen Überschuß an

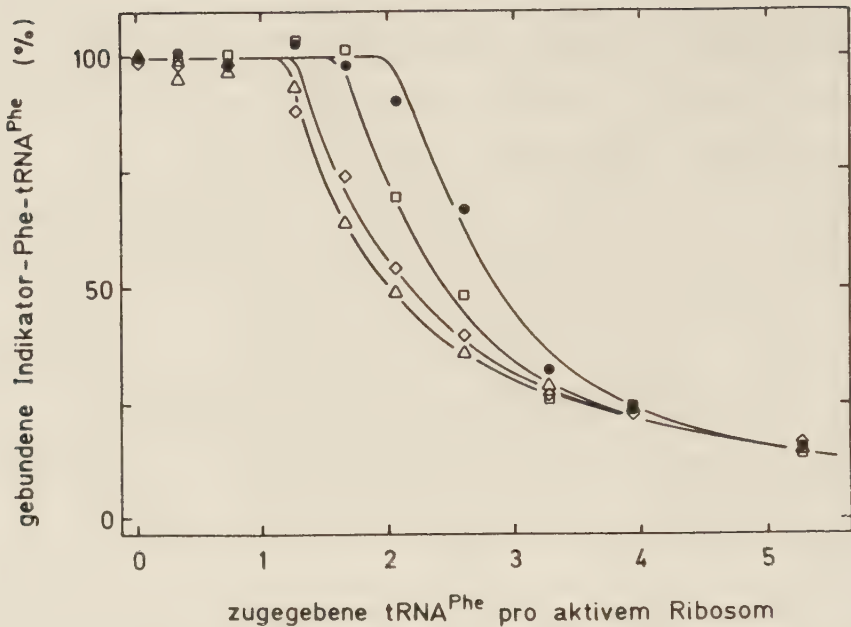


Abb. 23: Konkurrenz zwischen tRNA^{Phe} und tRNA^{Arg} bei der Bindung in die E-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen.

Zu Poly(U)-programmierten Ribosomen (0.3 μ M), deren P-Stelle blockiert war, wurden in Puffer A bei 20 mM Mg²⁺ steigende Mengen tRNA^{Phe} aus E. coli entweder allein oder zusammen mit verschiedenen Mengen an tRNA^{Arg} aus Hefe zugegeben. Nach einer Inkubation von 40 min wurde der Indikatorbindungstest der A-Stelle mit (¹⁴C)Phe-tRNA^{Phe}·EF-Tu·GTP (0.07 μ M) wie in Abb. 3 beschrieben durchgeführt. Die Stöchiometrie für die Sättigung der A-Stelle mit tRNA^{Phe} allein (●) wurde wie in Kap. 4.2. beschrieben durch Anpassung zu 2.0 bestimmt. In Gegenwart eines 1.4- (□), 6.7- (◇) und 20- (Δ) fachen Überschusses an tRNA^{Arg} (relativ zu tRNA^{Phe}) betrug die scheinbare Stöchiometrie 1.6, 1.2 und 1.1. Kontroll-experimente ohne die Zugabe von tRNA^{Phe} zeigten, daß auch bei einem 30fachen Überschuß an falsch-kodierter tRNA über Ribosomen die Bindung des ternären Komplexes in die A-Stelle nicht merklich (weniger als 10%) beeinflusst wird. Um die Empfindlichkeit solcher Experimente zu erhöhen, wurde hierbei eine stöchiometrische Menge an Phe-tRNA^{Phe}·EF-Tu·GTP (0.3 μ M) zugegeben.

$\text{tRNA}_3^{\text{Arg}}$ (relativ zu tRNA^{Phe}) sinkt die Stöchiometrie, mit der die A-Stelle mit tRNA^{Phe} gefüllt wird, auf nahezu eins, d.h. die E-Stelle ist offenbar fast vollständig mit $\text{tRNA}_3^{\text{Arg}}$ besetzt. Aus dem schon deutlichen Effekt in Gegenwart eines nur 1.4fachen Überschusses an $\text{tRNA}_3^{\text{Arg}}$ ist ersichtlich, daß die Bindung dieser falsch-kodierten tRNA in die E-Stelle nur unwesentlich (ca. viermal) schwächer ist als die von tRNA^{Phe} aus E. coli.

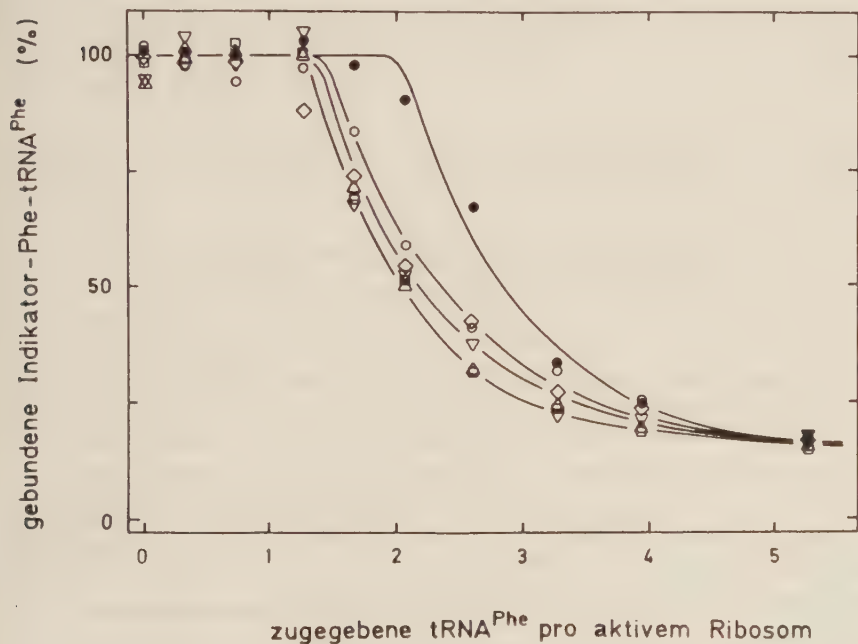


Abb. 24: Konkurrenz falsch-kodierter tRNAs mit tRNA^{Phe} bei der Bindung in die E-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen.

Die Titrationen wurden wie in Abb. 23 mit einem jeweils 6.7fachen Überschuß an falsch-kodierter tRNA über tRNA^{Phe} aus E. coli durchgeführt. Die (scheinbaren) Stöchiometrien für die Sättigung der A-Stelle mit tRNA^{Phe} betrugen bei tRNA^{Phe} alleine (●) 2.0, bei $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ (○) 1.4, bei $\text{tRNA}_2^{\text{Glu}}$ (▽) und $\text{tRNA}_3^{\text{Arg}}$ (◻) 1.2, bei $\text{tRNA}_f^{\text{Met}}$ (Δ) und tRNA^{Lys} (◻) 1.1.

Analoge Experimente wurden mit einer Reihe von falsch-kodierten tRNAs bei einem siebenfachen Überschuß (über tRNA^{Phe}) durchgeführt (Abb. 24). Mit allen untersuchten tRNAs wurde ein ähnlicher Effekt wie für tRNA^{Arg}₃ beschrieben erhalten; die unterschiedliche Effizienz jeder tRNA deutet jedoch auf charakteristische Unterschiede in den Affinitäten für die E-Stelle hin. Eine halb-quantitative Abschätzung ergab, daß die Affinitäten ca. 3-8mal schwächer sind als die für tRNA^{Phe} aus *E. coli* beobachtete (s. Tab. 5; S. 74). Vergleichbare Ergebnisse wurden bei 10 mM Mg²⁺ erhalten.

2.4.2. Inhibierung der Bindung von tRNA^{Phe}_{Prf16/20} in die E-Stelle

Die Bindung der fluoreszierenden tRNA^{Phe}_{Prf16/20} in die E-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen führt zu einem starken Anstieg der Fluoreszenzemission (s. 2.3.1.). Ist die E-Stelle jedoch schon teilweise mit nicht-fluoreszierender tRNA besetzt, so wird als Folge der kompetitiven Bindung beider tRNAs ein deutlich verminderter Signalanstieg beobachtet. Die Fluoreszenztitration in Abb. 25 verdeutlicht dies anhand der Konkurrenz zwischen tRNA^{Phe} (*E. coli*) bzw. tRNA^{Ser}_{1/2} (Hefe) und tRNA^{Phe}_{Prf16/20}. Poly(U)-programmierte Ribosomen, deren P- und A-Stellen mit N-AcPhe-tRNA^{Phe} blockiert waren, wurden mit tRNA^{Phe} bzw. tRNA^{Ser}_{1/2} präinkubiert. Dann wurde die Titration mit tRNA^{Phe}_{Prf16/20} wie in Abb. 14 beschrieben durchgeführt. Im Vergleich zur Titration der freien E-Stelle (Abb. 25) sind diese Titrationskurven sehr flach, d.h. ein jeweils geringerer Teil der fluoreszierenden tRNA bindet in die E-Stelle. Wie für eine kompetitive Bindung beider tRNAs zu erwarten ist, wird bei höherem Überschuß an tRNA^{Phe}_{Prf16/20} in allen

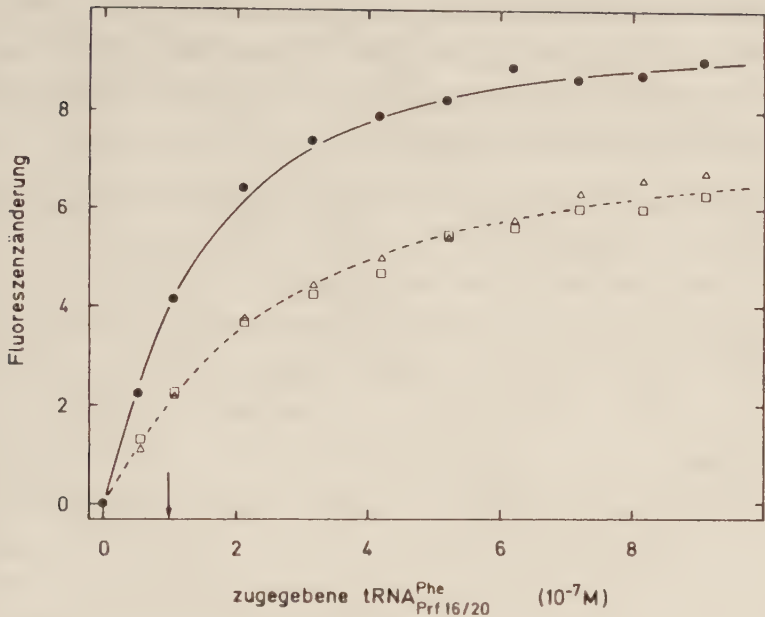


Abb. 25: Fluoreszenztitration der ribosomalen E-Stelle mit Proflavin-markierter tRNA^{Phe}_{Prf16/20} aus *E. coli* in Anwesenheit von kompetierenden, nicht-fluoreszierenden tRNAs.

Die P- und A-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen (0.11 μ M; Pfeil) wurde in Puffer A (20 mM Mg²⁺) mit N-AcPhe-tRNA^{Phe} blockiert. Dann wurde die E-Stelle mit 0.38 μ M tRNA^{Phe} aus *E. coli* (Δ) bzw. 2.0 μ M tRNA^{Ser}_{1/2} aus Hefe (□) inkubiert und schließlich die Titrationsen mit tRNA^{Phe}_{Prf16/20} wie in Abb. 14 beschrieben durchgeführt. Zum Vergleich ist die Titration der freien E-Stelle (●) gezeigt.

Titrationenkurven das gleiche Plateau erreicht (Anpassung). Im Einklang mit den Ergebnissen des vorigen Abschnitts kann auch die falsch-kodierte tRNA^{Ser}_{1/2} effizient mit tRNA^{Phe}_{Prf16/20} um die Bindung in die E-Stelle konkurrieren. Zur Erzielung eines mit tRNA^{Phe} vergleichbaren Effekts ist allerdings ein sechsmal höherer Über-

schuß an $\text{tRNA}^{\text{Ser}}_{1/2}$ notwendig, d.h. ihre Bindung in die E-Stelle ist etwas schwächer als die von tRNA^{Phe} . Konsistente Ergebnisse wurden erhalten, wenn fluoreszierende und kompetierende tRNAs gleichzeitig zugegeben wurden.

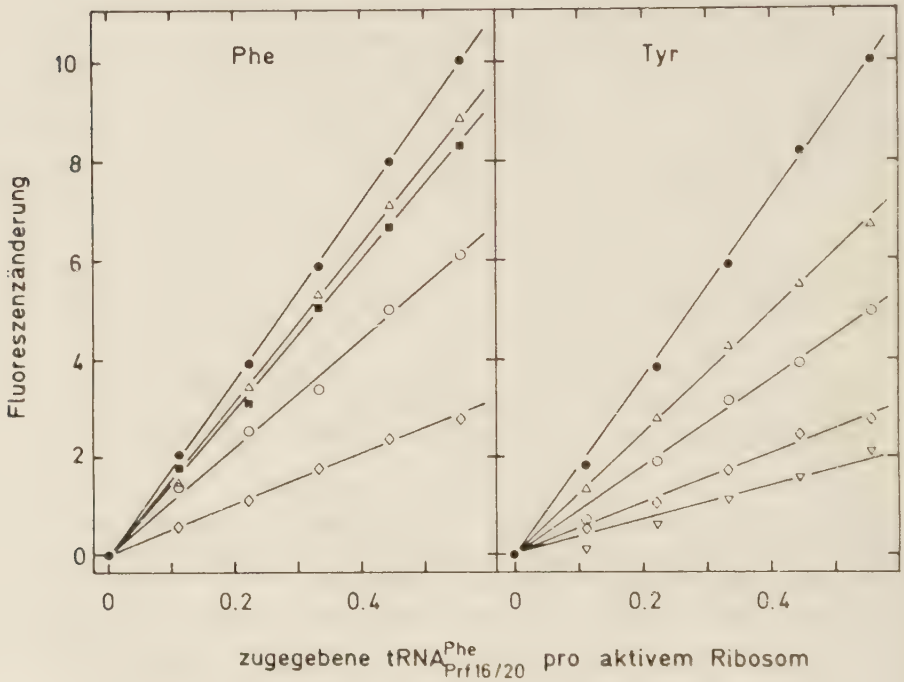


Abb. 26: Vergleich der Bindungsstärken von tRNA^{Phe} und tRNA^{Tyr} aus E. coli in der E-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen.

Die Titrations wurden wie in Abb. 25 mit $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Prf16/20}}$ durchgeführt, wobei nur die Anfangssteigung der Titrationskurven bestimmt wurde. Die Ribosomen ($0.23 \mu\text{M}$) waren mit steigenden Mengen an tRNA^{Phe} oder tRNA^{Tyr} aus E. coli präinkubiert. tRNA^{Phe} pro aktivem Ribosom 0 (●), 1.1 (Δ), 3.4 (○) und 8.6 (◇). tRNA^{Tyr} pro aktivem Ribosom 0 (●), 6.2 (Δ), 15.4 (○), 31 (◇) und 62 (▽). Zum Vergleich ist der Effekt bei Präinkubation mit einem 12fachen Überschuß an tRNA^{Phe} aus Hefe (■) gezeigt.

Zur weiteren Untersuchung des Effekts wurde nur der erste Teil der Titrationskurven bestimmt, der näherungsweise als linear betrachtet werden kann. Die Abnahme der Steigung solcher in Anwesenheit kompetierender, nicht-fluoreszierender tRNAs erhaltenen Kurven dient als Maß für die relative Bindungsstärke in der E-Stelle. In Abb. 26 werden zunächst tRNA^{Phe} (E. coli) und tRNA^{Tyr} (E. coli) miteinander verglichen. Dazu wurden steigende Mengen an nicht-markierter tRNA zu Ribosomen gegeben und nach Zugabe von tRNA^{Phe}_{Prf16/20} die Fluoreszenzänderung gemessen. Mit beiden tRNAs nimmt das Signal bei höheren tRNA-Konzentrationen deutlich ab. Da von der falsch-kodierten tRNA^{Tyr} nur etwa die doppelte Menge benötigt wird, um die gleiche Abnahme wie bei tRNA^{Phe} zu erhalten, kann man annehmen, daß tRNA^{Tyr} nur geringfügig schwächer als tRNA^{Phe} in die E-Stelle bindet. Die Wechselwirkung mit dem passenden Codon ist also nicht notwendig für eine effiziente Bindung in die E-Stelle.

Diese Folgerung wurde in analogen Versuchen mit verschiedenen anderen, falsch-kodierten tRNAs bestätigt. Dazu wurden die Ribosomen mit einem Überschuß dieser tRNAs präinkubiert und nach Zugabe von tRNA^{Phe}_{Prf16/20} die Fluoreszenzänderung registriert (Abb. 27). Ähnlich wie im vorigen Abschnitt beschrieben wurde wieder für jede tRNA eine unterschiedliche Steigung der Kurve gefunden, d.h. jede tRNA weist eine charakteristische Affinität für die E-Stelle auf. Besonders erwähnenswert ist ein Vergleich des Verhaltens von tRNA^{Tyr} und tRNA^{Leu}₂, welche zu den sog. "near-cognate" tRNAs gehören, deren zugehöriges Codon sich nur um eine Base vom UUU-Triplett unterscheidet (Tab. 5). Während für tRNA^{Tyr} ein sehr großer Signalabfall relativ zur freien E-Stelle beobachtet wurde,

bindet $\text{tRNA}_{2}^{\text{Leu}}$ sehr schwach. Das nahezu passende Anticodon in tRNA^{Tyr} scheint also keine geeignete Erklärung für die relativ hohe Affinität dieser tRNA zu sein.

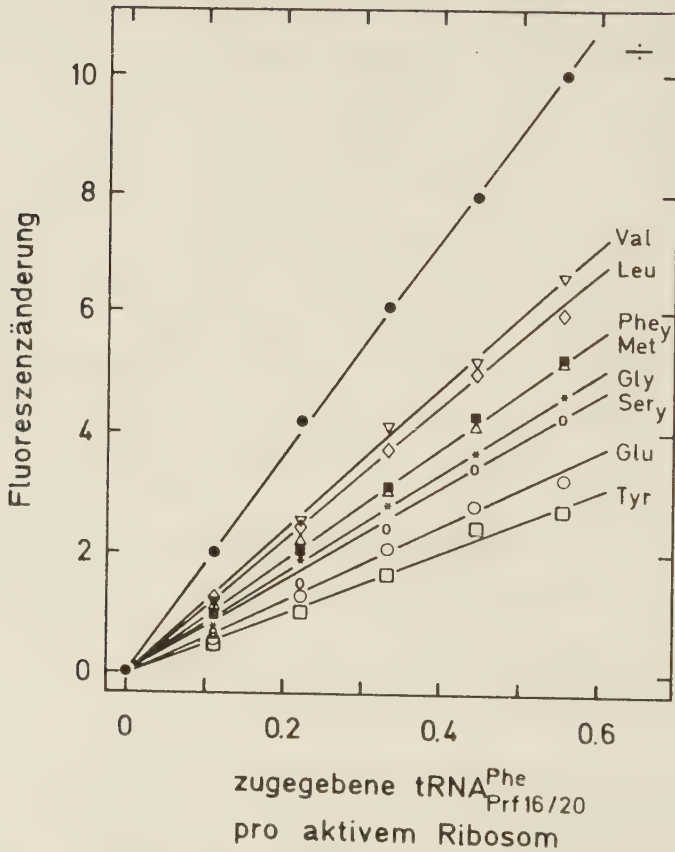


Abb. 27: Vergleich der Bindungsstärken verschiedener falsch-kodierter tRNAs in der E-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen.

Die Titrations wurden wie in Abb. 26 beschrieben mit einem jeweils 31fachen Überschuß an falsch-kodierter tRNA pro aktivem Ribosom durchgeführt. Die Titration mit tRNA^{Phe} aus Hefe ist mit geschlossenen Quadraten gezeigt.

Der Test erlaubt auch, das Verhalten der tRNA^{Phe} aus Hefe zu studieren, für die ja verglichen mit der homologen tRNA^{Phe} eine achtmal niedrigere Affinität (20 mM Mg^{2+}) für die E-Stelle gefunden wurde (s. Tab. 2). In guter Übereinstimmung dazu war eine achtfach höhere Konzentration an heterologer tRNA^{Phe} nötig, um einen ähnlichen Effekt wie mit tRNA^{Phe} aus *E. coli* zu erzielen (s. Abb. 26). Trotz des passenden Anticodons bindet tRNA^{Phe} aus Hefe sogar schlechter in die E-Stelle als vier der untersuchten falsch-kodierten tRNAs (tRNA^{Tyr} , $\text{tRNA}_1^{\text{Gly}}$, $\text{tRNA}_2^{\text{Glu}}$ und $\text{tRNA}_{1/2}^{\text{Ser}}$); mit vergleichbarer Affinität bindet die Initiator- $\text{tRNA}_f^{\text{Met}}$ (s. Abb. 27).

Zur quantitativen Auswertung der Daten wurde mit dem in Kapitel 4.3. erläuterten Formalismus für jede tRNA die Affinität für die E-Stelle berechnet. Die in Tab. 5 zusammengefaßten Ergebnisse sind bis auf eine Ausnahme, $\text{tRNA}_2^{\text{Glu}}$, identisch mit den aus dem Indikatorbindungstest erhaltenen Werten. Die Diskrepanz für $\text{tRNA}_2^{\text{Glu}}$ ist auf die komplementären Anticodons in tRNA^{Phe} und $\text{tRNA}_2^{\text{Glu}}$ zurückzuführen. Aus der Tatsache, daß die beiden tRNAs mit beträchtlicher Affinität Dimere bilden (Eisinger & Gross, 1975), ist auch unter den hier verwendeten Reaktionsbedingungen eine merkliche Komplexbildung zu erwarten, die wiederum die Gleichgewichtslage der tRNA-Bindung in die E-Stelle beeinflußt. Wegen der extrem stabilen Bindung des ternären Komplexes in die A-Stelle kann im Indikatorbindungstest die Dimerenbildung der Indikator-tRNA ($\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}} \cdot \text{EF-Tu} \cdot \text{GTP}$) mit $\text{tRNA}_2^{\text{Glu}}$ sicher vernachlässigt werden; im Fluoreszenztest hingegen führt die merkliche Komplexbildung zwischen dem Indikatormolekül $\text{tRNA}_{\text{Prf16/20}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNA}_2^{\text{Glu}}$ zu einer geringeren Bindung von $\text{tRNA}_{\text{Prf16/20}}^{\text{Phe}}$ in die E-Stelle und damit zu einer scheinbar höheren Affinität der E-

Tab. 5: Bindung falsch-kodierter tRNAs in die E-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen aus *E. coli*: Vergleich der Anticodons, der Sequenz des Anticodonstammes und der Assoziationskonstanten mit den kodierten tRNA^{Phe}s aus *E. coli* und Hefe

tRNA	Spezies	Anti-codon ^a	Basenp. m. UUU ^b	Basensubst. AC-Stamm ^c	GC-Paare AC-Stamm ^d	K(Phe) ^e K(non)
Phe	<i>E. coli</i>	GAA	=3	=0	4	=1
Phe	Hefe	GAA	3	6	3	5 ^f
Leu ₂	<i>E. coli</i>	GAG	2	10	3	7 ^f
Tyr	<i>E. coli</i>	GUA	2	4	3	1.7 ^f
Ser _{1/2}	Hefe	IGA	2	6	1	3 ^f
Val ₁	<i>E. coli</i>	UAC	1	10	4	8 ^{fg}
Met _f	<i>E. coli</i>	CAU	1	6	4	4 ^{fg}
Arg ₃	Hefe	UCU	0	6	2	4 ^g
Glu ₂	<i>E. coli</i>	UUC	0	8	5	6 ^g (2 ^f)
Gly ₁	<i>E. coli</i>	CCC	0	6	3	3 ^f
Lys	<i>E. coli</i>	UUU	0	5	1	3 ^g

^a Nach den tRNA-Sequenzdaten von Gauss & Sprinzl (1983); Basenmodifizierungen wurden vernachlässigt (I: Inosin). ^b Die nach der "wobble"-Hypothese (Crick, 1966) maximal mögliche Zahl der Basenpaarungen des Anticodons mit dem UUU-Triplett. ^c Zahl der Basensubstitutionen im Anticodonstamm relativ zur tRNA^{Phe} aus *E. coli*; Basenmodifizierungen wurden vernachlässigt. ^d Zahl der GC-Basenpaare im Anticodonstamm. ^e K(Phe) bzw. K(non) bezeichnen die Assoziationskonstanten der E-Stelle für tRNA^{Phe} aus *E. coli* bzw. für tRNA^{Phe} aus Hefe und die jeweiligen falsch-kodierten tRNAs. Die Parameter wurden entweder ^f mit der Fluoreszenztechnik (s. 2.4.2.) ermittelt (Auswertung s. Kap. 4.3.) oder ^g mit dem Indikatorbindungstest (s. 2.4.1.) abgeschätzt.

Stelle für $\text{tRNA}_2^{\text{Glu}}$. Das zuverlässigere Ergebnis ist nach diesen Überlegungen aus dem Indikatorbindungstest zu erwarten. Es sollte ergänzt werden, daß für das Dimerenpaar $\text{tRNA}^{\text{Phe}}/\text{tRNA}^{\text{Lys}}$ mit ebenfalls komplementären Anticodons (Tab. 5) eine zehnfach schwächere Komplexbildung als bei $\text{tRNA}^{\text{Phe}}/\text{tRNA}_2^{\text{Glu}}$ gemessen wurde (Grosjean et al., 1978); während der Titration mit tRNA^{Lys} ist daher keine vergleichbare Komplikation zu erwarten.

Aus Tab. 5 ist leicht ersichtlich, daß der Codon-Anticodon-Wechselwirkung in der E-Stelle keine wesentliche stabilisierende Rolle zukommt. In Übereinstimmung mit Ergebnissen aus Abstandsmessungen zwischen tRNAs in der P- und E-Stelle (Paulsen & Wintermeyer, 1986) zeigen die vorgelegten Daten, daß kein Kontakt zwischen Codon und Anticodon existiert oder zumindest äußerst schwach ist. Allerdings vermag die E-Stelle aufgrund anderer Kriterien zwischen den verschiedenen tRNAs zu unterscheiden. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung wird im folgenden Abschnitt erörtert.

2.4.3. Die Affinität korreliert mit dem Grad der Homologie zum Anticodonstamm der tRNA^{Phe} aus E. coli

Die tRNA-Bindung in die ribosomale E-Stelle ist zwar weitgehend unabhängig von der Anwesenheit des komplementären Codons, jedoch ist die Affinität offenbar charakteristisch für jede tRNA. Zur Klärung der Ursache für das unterschiedliche Verhalten der einzelnen tRNAs wurden ihre Nukleotidsequenzen mit der von tRNA^{Phe} aus E. coli verglichen (Gauss & Sprinzl, 1983). Wie in Abb. 28 verdeutlicht, ergab sich dabei für alle tRNAs (unter Berücksichtigung des Ergebnisses aus dem Indikatorbindungstest

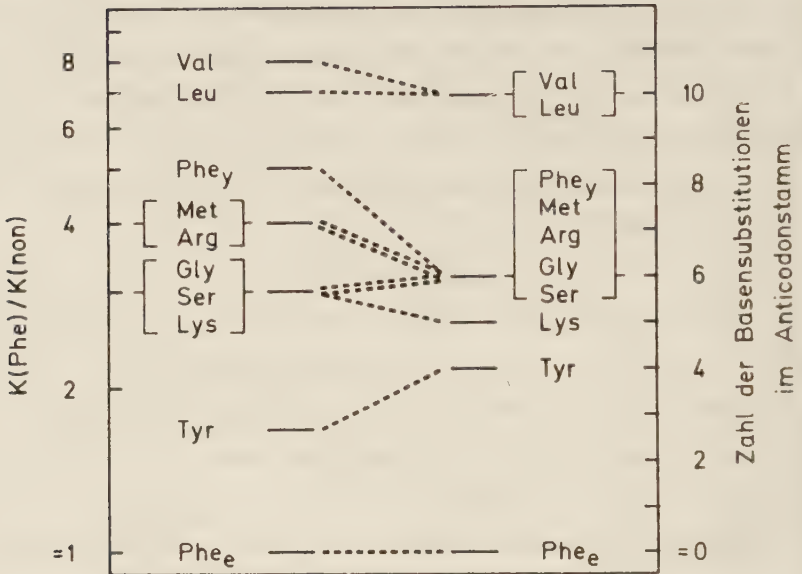


Abb. 28: Korrelation der relativen Affinitäten falsch-kodierter tRNAs mit dem Grad der Homologie zum Anticodonstamm der tRNA^{Phe} aus *E. coli*.

Die relativen Affinitäten $K(\text{Phe})/K(\text{non})$ (dargestellt in logarithmischer Auftragung) und die Zahl der Basensubstitutionen im Anticodonstamm relativ zur tRNA^{Phe} aus *E. coli* sind Tab. 5 entnommen.

auch für tRNA₂^{Glu}, s. 2.4.2.) eine strenge Korrelation zwischen dem Grad der Homologie zum Anticodonstamm von tRNA^{Phe} (*E. coli*) und der Bindungsstärke in die E-Stelle (s. auch Tab. 5). Der Sequenzvergleich für die restlichen Teile der tRNA (ohne Berücksichtigung des Anticodons) zur Kontrolle zeigte keine erkennbaren Beziehungen zur Bindungsstärke (o. Abb.). Offensichtlich stellt der Anticodonstamm einen Teil der tRNA dar, der mit der E-Stelle

des Ribosoms in Wechselwirkung tritt und dabei auf die Bindungsstärke der tRNA modulierend wirkt. Es sollte ergänzt werden, daß für die benachbarte Anticodonschleife (ohne das Anticodon selbst) eine analoge Korrelation nicht sinnvoll ist, weil die Basen in Position 32 (Pyrimidin), 33 (U), 37 (modifiziertes Purin) und 38 (A) konserviert bzw. semikonserviert sind.

Der Doppelstrang des Anticodonstammes in tRNA^{Phe} aus E. coli besitzt durch vier GC-Paare eine beträchtliche Stabilität, was hinsichtlich der Bindungsstärke in die E-Stelle von diskriminierender Bedeutung sein könnte. Aus Tab. 5 geht jedoch hervor, daß z.B. die schwach bindende tRNA^{Val}₁ ebenfalls vier GC-Paare aufweist, während tRNA^{Lys} und tRNA^{Ser}_{1/2} trotz nur eines GC-Paares relativ stark binden. Offenbar ist also weniger die Stabilität des Doppelstranges im Anticodonstamm von Bedeutung als eine definierte Struktur, welche allerdings nicht ohne weiteres aus der Sequenz abzuleiten ist.

2.4.4. Das 3'-terminale Adenosin einer tRNA ist entscheidend für eine effiziente Bindung in die E-Stelle

Die spezifische Unterscheidung zwischen beladener und unbeladener tRNA durch die ribosomale E-Stelle macht eine Wechselwirkung des 3'-Endes einer tRNA mit der E-Stelle wahrscheinlich. Allerdings ist nicht ohne weiteres auszuschließen, daß eine unterschiedliche Konformation der beiden tRNA-Arten zu der beobachteten Diskriminierung führt. Es war deshalb interessant, die Bindungsstärke von tRNAs, deren Akzeptorende verkürzt war, durch den in Abschnitt 2.4.2. beschriebenen Fluoreszenztest mit tRNA^{Phe}_{Prf16/20} zu bestimmen.

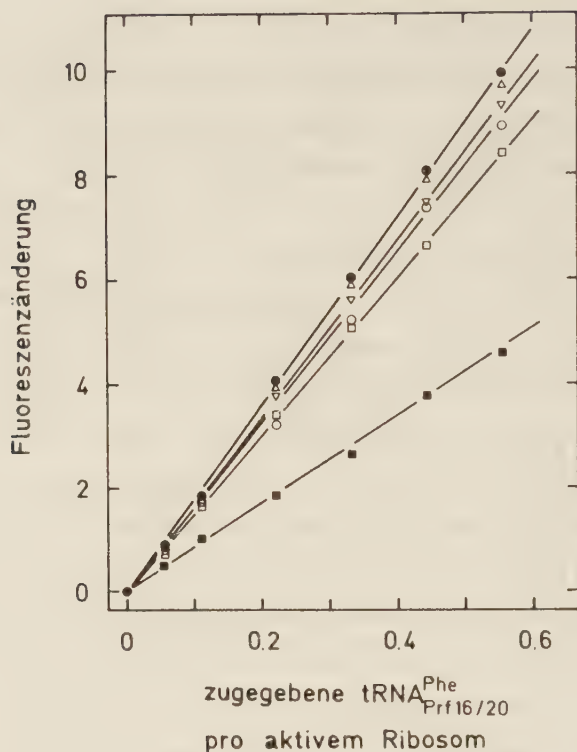


Abb. 29: Einfluß des 3'-Endes einer tRNA auf die Bindungsstärke in der E-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen.

Die Titrations wurden wie in Abb. 26 beschrieben durchgeführt. Die Ribosomen wurden mit einem jeweils 31fachen Überschuß an $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(-\text{A})$ (O), $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(-\text{ACCA})$ (▽) und nicht-modifizierter tRNA^{Phe} (■) aus Hefe oder an $\text{tRNA}_{\text{f}}^{\text{Met}}(-\text{A})$ aus E. coli (Δ) bzw. mit einem 160fachen Überschuß an $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(-\text{A})$ (□) präinkubiert.

Bereits die Entfernung des 3'-terminalen Adenosins in tRNA^{Phe} aus Hefe oder in $\text{tRNA}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ aus E. coli (im folgenden mit $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(-\text{A})$ bzw. $\text{tRNA}_{\text{f}}^{\text{Met}}(-\text{A})$ bezeichnet) resultiert in einer drastischen Erniedrigung der Affinität für die E-Stelle (Abb.

29). Auch durch einen sehr hohen Überschuß (160fach relativ zu Ribosomen) an $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(-\text{A})$ wurde die Bindung von $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{Prf16/20}}$ in die E-Stelle nur unwesentlich inhibiert. Die Auswertung der Daten nach Kap. 4.3. ergab, daß das Fehlen des 3'-terminalen Adenosins in tRNA^{Phe} zu einer mindestens zehnfachen Reduktion der Affinität (relativ zur unmodifizierten tRNA^{Phe} aus Hefe, Abb. 29) führt. Ein qualitativ ähnliches Ergebnis wurde aus Ultrazentrifugationsversuchen mit nicht-programmierten Ribosomen und verkürzter tRNA^{Phe} aus *E. coli* erhalten (Grajevskaja et al., 1982).

Mit der um vier Nukleotide verkürzten $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(-\text{ACCA})$ aus Hefe war ein ähnlicher Effekt wie mit $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(-\text{A})$ zu beobachten (Abb. 29), d.h. die wesentliche Schwächung der Affinität wird durch Verkürzung um nur ein Nukleotid hervorgerufen. Es scheint also zwischen dem 3'-terminalen Adenosin und einem Bereich der E-Stelle ein spezifischer Kontakt zu existieren, der einen wesentlichen Teil der Bindungsstärke für die tRNA-Bindung in die E-Stelle liefert. Allerdings könnte die Schwächung der Bindung auch auf die Störung der Basenstapelung des Akzeptorendes bei Entfernung des 3'-terminalen Adenosins zurückzuführen sein. Zur Klärung dieser Frage sind weitere Experimente mit am 3'-Ende modifizierten tRNAs nötig. Jedenfalls ist nach diesen Ergebnissen eher unwahrscheinlich, daß die ribosomale E-Stelle beladene und unbeladene tRNAs aufgrund konformativer Unterschiede diskriminiert, denn es ist bekannt, daß die 3'-terminale CCA-Sequenz sich nicht an tertiären Wechselwirkungen mit anderen Regionen der tRNA beteiligt (Chládek & Sprinzl, 1985).

3. DISKUSSION

3.1. Die ribosomalen tRNA-Bindungsstellen und ihre Affinitäten

In Übereinstimmung mit älteren (deGroot et al., 1971; Odinzov & Kirillov, 1978) und neueren Ergebnissen (Schmitt et al., 1981; 1982; Kirillov & Semenov, 1982) wurden in dieser Arbeit auf Ribosomen aus *E. coli* zwei Bindungsstellen (P- und A-Stelle) für aminoacylierte tRNA gefunden. Die durchgeführten Sättigungstitrationen schließen die Existenz einer weiteren Bindungsstelle für aminoacylierte tRNA mit einer Affinität von größer als 10^5 M^{-1} aus. Entgegen dem Postulat von Rheinberger et al. (1981; 1983) konnte eindeutig gezeigt werden, daß beide Bindungsstellen gleichzeitig mit N-AcPhe-tRNA^{Phe} (einem Peptidyl-tRNA-Analogen) besetzt sein können, daß also die Besetzung der P-Stelle mit N-AcPhe-tRNA^{Phe} die Bindung eines weiteren Moleküls N-AcPhe-tRNA^{Phe} in die A-Stelle nicht ausschließt. Für deacylierte tRNA wurde die Existenz einer zusätzlichen, dritten Bindungsstelle, der sog. E-Stelle, bestätigt (Rheinberger et al., 1981).

In Gegenwart von Poly(U) als mRNA bindet tRNA^{Phe}, abhängig von der tRNA-Art (deacylierte tRNA^{Phe} oder N-AcPhe-tRNA^{Phe}) und den ionischen Bedingungen, mit Affinitäten zwischen 10^8 und $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ in die P-Stelle. Die Bindungsstärke der A-Stelle ist generell 20-200fach niedriger. Für die Bindung deacylierter tRNA^{Phe} in die E-Stelle wurden sehr ähnliche Affinitäten wie für die A-Stelle erhalten (Tab. 2 und 3).

Die Aminoacylierung der tRNA^{Phe} führt allgemein zu einer Erhöhung der Bindungsstärke. Der Einfluß der Aminoacyl- bzw. der N-Acetyl-phenylalanylgruppe ist deutlich zu sehen aus dem Ver-

gleich der Bindungskonstanten von deacylierter tRNA^{Phe} mit der von $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ in der A-Stelle oder von $\text{N-AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ in der P- und A-Stelle. Am deutlichsten ist der Unterschied zwischen der P-Stellenbindung von tRNA^{Phe} und $\text{N-AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ bei 10 mM Mg^{2+} ; unter diesen Bedingungen bindet diese 40mal stärker als jene, ein Befund, der möglicherweise physiologische Bedeutung hat (s. 3.2.). Die generell stärkere Bindung beladener tRNA ist vereinbar mit der Vorstellung, daß auch die Aminoacyl- bzw. Peptidylgruppe in Wechselwirkung mit dem Ribosom steht. Hiermit im Einklang sind die deutlichen Unterschiede in der Geschwindigkeit (2.2.1.) und Stabilität (2.2.2.) der Bindung beladener und unbeladener tRNA in der P-Stelle unprogrammierter Ribosomen, wo der stabilisierende Effekt der Aminoacylierung noch stärker ausgeprägt ist.

In Gegenwart von EF-Tu und GTP wurde für die Bindung von $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ in die A-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen eine Bindungskonstante von größer als 10^{11} M^{-1} erhalten (2.3.3.). Der beträchtliche Affinitätsanstieg im Vergleich zur nicht-enzymatischen Bindung (mehr als vier Größenordnungen bei 10 mM Mg^{2+} -Konzentration; Tab. 3) ist jedoch nicht ohne weiteres ein Hinweis auf eine stärkere Bindung des ternären Komplexes selbst, da an die Bindungsreaktion die Hydrolyse von GTP zu GDP gekoppelt ist. Bei vollständiger Kopplung ist dadurch eine Verschiebung der Gleichgewichtslage der Gesamtreaktion um den Faktor 10^8 (Stryer, 1981) und damit eine Bindungskonstante von 10^{15} M^{-1} zu erwarten. Die auch bei sehr niedrigen Ribosomenkonzentrationen stöchiometrische Besetzung der A-Stelle mit $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ in Gegenwart von EF-Tu·GTP stellt also keine echte Gleichgewichtssituation dar, sondern ist eine Folge der sehr langsamen Dissoziation der tRNA aus der A-Stelle.

Eine direkte Messung der Affinität der Bindung des ternären Komplexes einer Aminoacyl-tRNA mit EF-Tu·GTP in die ribosomale A-Stelle ist bisher nicht beschrieben. Mit GTP(γ S) jedoch, einem nur langsam hydrolysierbaren GTP-Analogon, konnten Thompson und Karim (1982) die Geschwindigkeitskonstanten für die Bindung und Dissoziation des ternären Komplexes Phe-tRNA^{Phe}·EF-Tu·GTP(γ S) in der A-Stelle bestimmen und daraus eine Bindungskonstante von $1.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ errechnen. Verglichen mit der nicht-enzymatischen Bindung von Phe-tRNA^{Phe} ist die Bindungsstärke um ca. zwei Größenordnungen erhöht (Tab. 3), d.h. zwischen dem Protein und der ribosomalen Oberfläche existiert eine merkliche Wechselwirkung von ca. 3 kcal/mol. Diese Beobachtung ist konsistent zu dem Vorschlag von Chetverin & Spirin (1982), die als Funktion der GTP-Hydrolyse - neben der des Korrekturlesens des Ribosoms (dem sog. "proofreading"; Hopfield, 1974; Ninio, 1975; Kurland & Ehrenberg, 1984) - die Erleichterung der Dissoziation des Proteins vom tRNA-Ribosomen-Komplex, also die Bereitstellung der Energie zur Entfernung des Enzyms, postuliert hatten.

Die Abwesenheit von mRNA beeinflusst die Affinitäten der einzelnen Bindungsstellen für tRNA sehr unterschiedlich. Die Bindung in die P-Stelle wird durch das Weglassen der mRNA je nach Mg^{2+} -Konzentration um 2-4 Größenordnungen schwächer; bei 20 mM Mg^{2+} ist die Affinität immerhin noch $4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ für deacylierte tRNA^{Phe} und $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ für N-AcPhe-tRNA^{Phe}. Die Bindung in die A-Stelle hingegen war auch mit der Fluoreszenzmethode nicht mehr nachweisbar; aus der untersten Erfassungsgrenze wurde eine Affinität von höchstens 10^5 M^{-1} abgeschätzt. In deutlichem Gegensatz zur starken mRNA-Abhängigkeit der Bindung in die P- und A-Stelle wird die Bindung in die E-Stelle in Abwesenheit von mRNA nicht wesentlich

(maximal vierfach) geschwächt (Tab. 4). Dieser geringe Einfluß der mRNA ist nach Messungen der Stärke von Wasserstoffbrückenbindungen vereinbar mit der Ausbildung höchstens einer, sehr schwachen Wasserstoffbrücke (Fersht et al., 1985). Das Fehlen einer stabilisierenden Codon-Anticodon-Wechselwirkung könnte auch eine Erklärung für die im Vergleich zur programmierten P- und A-Stelle sehr ausgeprägte Labilität der tRNA-Bindung in der E-Stelle sein. Zu dieser Deutung paßt gut, daß in Abwesenheit von mRNA auch die Bindung in die P-Stelle extrem labil ist (Tab. 1 und 2.2.2.).

Wie in der "Einleitung" erwähnt, sind die Variationen der bisher in der Literatur publizierten Bindungskonstanten für die Wechselwirkung zwischen tRNA und ihren ribosomalen Bindungsstellen beträchtlich. Ohne in Einzelheiten zu gehen, sind die großen Unterschiede der älteren Daten wohl vor allem auf Probleme bei der Herstellung einheitlicher Ribosomenpräparationen zurückzuführen. Vergleicht man die Daten aus neueren Arbeiten mit den hier erhaltenen Werten, so ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kirillov und Mitarbeitern (Kirillov & Semenov, 1982; Kirillov et al., 1983), zumindest, was die Bindung in die A- und E-Stelle betrifft. Die bei den Resultaten für die P-Stelle erhaltenen, z.T. beträchtlichen Diskrepanzen sind vermutlich durch die von diesen Autoren angewendete Titrations-technik zu erklären, bei der Ribosomen immer im Überschuß zu tRNA gehalten wurden, um die Komplikation der gleichzeitigen Bindung der tRNA in die A- (und E-)Stelle bei der Titration der P-Stelle zu verhindern. Ein solches Vorgehen führt nach eigenen, nicht erwähnten Experimenten zu einer Überschätzung der Menge der in der P-Stelle gebundenen tRNA. Die Abweichungen zu anderen

Arbeiten sind, neben fehlerhaften Annahmen zur Zahl der ribosomalen tRNA-Bindungsstellen, auf die ungenügende Auswertungsprozedur der Titrationsdaten (Rheinberger et al., 1981) oder auf die Verwendung von Oligonukleotiden anstelle von Poly(U) als mRNA (Schmitt et al., 1982) zurückzuführen.

3.2. Funktionelle Bedeutung der E-Stelle für den Elongationszyklus der Proteinbiosynthese

Die meisten in der Vergangenheit aufgestellten Modelle zum molekularen Mechanismus des Elongationsschrittes der Proteinbiosynthese beruhen auf der Existenz zweier, funktionell unterscheidbarer Bindungsstellen für tRNA, der P- und A-Stelle (s. z.B. Watson, 1964; Spirin, 1969; Woese, 1970; Leder, 1973). Der Nachweis einer weiteren tRNA-Bindungsstelle, der E-Stelle, wirft jedoch die Frage auf, ob und inwieweit die Existenz dieser Bindungsstelle eine Modifizierung bisheriger Modellvorstellungen notwendig macht.

Mehrere Befunde deuten darauf hin, daß die E-Stelle eine spezifische tRNA-Bindungsstelle darstellt, die am Elongationszyklus funktionell beteiligt ist. Erstens wurde beobachtet, daß während der Translokation die in der P-Stelle gebundene deacylierte tRNA nicht sofort das Ribosom verläßt, sondern zunächst von der P- in die E-Stelle geschoben wird; erst nach diesem Schritt erfolgt schließlich die Dissoziation vom Ribosom (Rheinberger & Nierhaus, 1983; Robertson et al., 1984; Wintermeyer et al., 1985b). Zweitens wurden definierte Bereiche der tRNA als spezifische Bindungsorte in der E-Stelle gefunden (s. 3.3.). Drittens ist die im Vergleich zur P- und A-Stelle sehr große

Labilität der tRNA-Bindung in die E-Stelle gut mit der Vorstellung vereinbar, daß von dieser Bindungsstelle aus die Dissoziation vom Ribosom rasch erfolgen kann. Schließlich deutet auch die Konservierung der E-Stelle als spezifische tRNA-Bindungsstelle auf eine für den Gesamtprozeß wichtige Bedeutung dieses Bereiches am Ribosom hin.

Vor kurzem wurde von Nierhaus (1982; 1984; Nierhaus & Rheinberger, 1984) ein neues Modell für die Proteinbiosynthese vorgeschlagen, das in Anlehnung an einen bereits früher von Noll (1966) gemachten Vorschlag auf der Existenz dreier tRNA-Bindungsstellen am Ribosom beruht. Nach diesem Modell wird die zusätzlich zur P- und A-Stelle vorhandene E-Stelle nach der Translokation von deacylierter tRNA besetzt, wobei die Funktion der E-Stelle darin gesehen wird, daß eine zweite tRNA am Ribosom zusätzlich zur Peptidyl-tRNA in der P-Stelle die mRNA in einer definierten Position fixieren muß, um eine Verschiebung des Leserasters zu verhindern (Rheinberger & Nierhaus, 1983). Die hier vorgelegten Daten unterstützen allerdings eine solche Bedeutung der E-Stelle schon wegen der fehlenden Codon-Anticodon-Wechselwirkung nicht. Darüberhinaus scheint eine solche Eigenschaft der E-Stelle auch nicht notwendig zu sein, da sowohl die hohe Stabilität der Bindung einer Peptidyl-tRNA in der P-Stelle als auch der beträchtliche Beitrag der Codon-Anticodon-Wechselwirkung zur Bindungsstärke in der P-Stelle ausreichend für das Festhalten der mRNA ist.

Die in dieser Arbeit erhaltenen thermodynamischen und kinetischen Daten machen eine andere funktionelle Bedeutung der E-Stelle wahrscheinlich. Der im folgenden entworfene Vorschlag beinhaltet, daß eine thermodynamisch exergonische, jedoch langsame Reaktion durch die Aufteilung in zwei Teilschritte beträcht-

lich beschleunigt wird. Zur Erläuterung dieser Hypothese ist es notwendig, das Ausmaß der Translokation und die Geschwindigkeit der Dissoziation der deacylierten tRNA vom Ribosom ohne und mit Beteiligung der E-Stelle zu vergleichen. Dabei soll zunächst nur der nicht-enzymatische Elongationszyklus ohne Hydrolyse von GTP betrachtet werden. Wie in der "Einleitung" erwähnt, ist ein solcher Reaktionsablauf tatsächlich beobachtet worden (Gavrilova et al., 1976; Spirin, 1978); die Triebkraft der Reaktion liegt darin, daß in der Gesamtbilanz eine "energiereiche" Esterbindung unter Energiegewinn umgewandelt wird in eine Peptidbindung (Chetverin & Spirin, 1982).

Unmittelbar vor der Translokation wird die ribosomale P-Stelle von deacylierter tRNA, die A-Stelle von Peptidyl-tRNA besetzt. Das entscheidende Problem im nun folgenden Translokationsschritt ist die Auflösung der extrem stabilen Bindung der deacylierten tRNA in der P-Stelle. Von der thermodynamischen Betrachtung her ist eine fast quantitative Bindung zu erwarten, d.h. es ist zunächst unverständlich, warum deacylierte tRNA überhaupt in nennenswertem Umfang die P-Stelle des Ribosoms verläßt. Eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung Dissoziation ist jedoch möglich durch die Bindung einer Aminoacyl-tRNA in die nach Translokation unbesetzte A-Stelle und den rasch erfolgenden Peptidtransfer (Gast et al., 1985) von der Peptidyl-tRNA in der P-Stelle.

Betrachtet man zunächst die spontane Translokation ohne die Einbeziehung der E-Stelle, also die Dissoziation der deacylierten tRNA vom Ribosom in einem Schritt, so ist dieser Prozeß wegen der enormen Stabilität der Bindung in die P-Stelle zum einen extrem langsam. Zum anderen liegt wegen der hohen Affinität der tRNA-

Bindung das Gleichgewicht der Reaktion praktisch vollständig auf der Seite vor Translokation. Zur Verschiebung dieses Gleichgewichts durch die Besetzung der A-Stelle mit Aminoacyl-tRNA und den unmittelbar folgenden Peptidtransfer (s.o.) steht deshalb nur eine sehr geringe Konzentration an Ribosomen mit freien A-Stellen zur Verfügung. Die resultierende Dissoziationsgeschwindigkeit ist deshalb viel zu klein, um die beobachtete Geschwindigkeit der spontanen Translokation (Gavrilova et al., 1976; Bergemann & Nierhaus, 1983) erklären zu können.

Der Translokationsschritt unter Einbeziehung der E-Stelle ist dagegen sowohl thermodynamisch als auch kinetisch gesehen günstiger. Hierfür ist wichtig, daß die Verschiebung der Peptidyl-tRNA von der A- in die P-Stelle und der deacylierten tRNA von der P- in die E-Stelle gekoppelt abläuft (Paulsen & Wintermeyer, 1986). Deshalb sind für das Verständnis der Triebkraft der spontanen Translokation weniger die absoluten als die relativen Affinitäten der tRNA-Bindungsstellen von Bedeutung. Da die Bindungsstärke in der A- und E-Stelle sehr ähnlich ist, wird die Gleichgewichtslage dieser synchronen Verschiebung der beiden tRNAs hauptsächlich vom Verhältnis der Bindungskonstanten von deacylierter und von Peptidyl-tRNA in der P-Stelle bestimmt. Bei 10 mM Mg^{2+} , also bei annähernd physiologischen Bedingungen, ergibt sich eine Gleichgewichtskonstante von ungefähr zehn, d.h. das Gleichgewicht liegt deutlich auf der Seite nach Translokation, was gut zu dem Befund von Gavrilova et al. (1976) paßt, die für die spontane Translokation ein Optimum bei 8 mM Mg^{2+} gefunden hatten. In einer früheren Arbeit war als hauptsächliche Triebkraft der Translokation das Verhältnis der Affinitäten von Peptidyl-tRNA in der A- und P-Stelle vermutet worden (Holschuh et al., 1981;

Gassen, 1982). Nach den obigen Überlegungen wird jedoch klar, daß erst durch die Einbeziehung der E-Stelle die Translokation exergonisch wird.

Die eigentliche Bedeutung der E-Stelle liegt jedoch nicht in der höheren Translokationsausbeute, sondern in der Beschleunigung der Gesamtreaktion. Bei der direkten Dissoziation aus der P-Stelle muß zumindest die Bindungsenergie deacylierter tRNA in der P-Stelle (ca. 11 kcal/mol) als Aktivierungsenergie aufgebracht werden. Demgegenüber ist bei der Verschiebung deacylierter tRNA in die E-Stelle anzunehmen, daß die Aktivierungsenergie dieses Prozesses insgesamt tiefer liegt, da im Übergangszustand eine permanente Bindung der beiden tRNAs an die ribosomale Oberfläche, also die kontinuierliche Wechselwirkung mit dem Ribosom, sehr wahrscheinlich ist. Der nächste Schritt, die Dissoziation aus der E-Stelle, erfordert zumindest die Bindungsenergie deacylierter tRNA in der E-Stelle (ca. 9 kcal/mol). Schon diese relativ geringe Differenz von 2 kcal/mol beschleunigt aber die Gesamtreaktion bei Beteiligung der E-Stelle 30fach. Wegen der beträchtlichen Stabilitätsunterschiede der tRNA-Bindung in die P- und E-Stelle ($>10^3$ fach) ist sogar ein noch wesentlich größerer kinetischer Vorteil bei der transienten Besetzung der E-Stelle zu erwarten. Wie im Fall ohne die E-Stelle beschrieben (s.o.), wird auch hier das Gleichgewicht der Gesamtreaktion durch die Bindung von "energiereicher" Aminoacyl-tRNA in die A-Stelle verschoben, wozu in diesem Fall eine wesentlich höhere Konzentration an post-translokativem Komplex zur Verfügung steht. Der wesentliche Vorteil der Beteiligung der E-Stelle liegt demnach in der höheren

Geschwindigkeit der Gesamtreaktion. Diese ist eine Folge der sowohl schnelleren als auch effizienteren Entfernung der deacylierten tRNA aus der P-Stelle.

Unter physiologischen Bedingungen wird der Translokations-schritt durch den Elongationsfaktor G katalysiert, wobei ein Molekül GTP hydrolysiert wird. Wie in der "Einleitung" erwähnt, wird die Energie des GTP nicht zur Lösung der Bindung der deacylierten tRNA in der P-Stelle oder zur mechanischen Bewegung der tRNAs verwendet, wie dies früher vermutet worden war (Lipmann, 1969). Neuere Ergebnisse zeigten nämlich, daß die Translokation auch in Gegenwart nicht-hydrolysierbarer GTP-Analoga abläuft (Inoue-Yokosawa et al., 1974; Modolell et al., 1975). Direkte kinetische Messungen ergaben Überdies, daß die GTP-Hydrolyse erst nach der Verschiebung des tRNA/mRNA-Komplexes erfolgt (Robertson et al., 1986). Aus solchen Befunden ist abzuleiten, daß die bloße Verschiebung um ein Codon ein spontaner, also exergonischer Vorgang ist. Die geschilderten Ergebnisse sind thermodynamisch nur bei Beteiligung der E-Stelle am Gesamtprozeß zu verstehen, da während der Translokation der Verlust an Bindungsenergie der Peptidyl-tRNA in der A-Stelle in etwa aufgewogen wird durch die Bindung der deacylierten tRNA in der E-Stelle. Damit lassen sich auch für den enzymatisch katalysierten Vorgang die gleichen Schlußfolgerungen ziehen wie für den oben diskutierten, nicht-enzymatischen Fall.

Die Existenz der E-Stelle ermöglicht also eine zweistufige Ausführung der Dissoziation deacylierter tRNA aus der P-Stelle, wodurch eine deutliche Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen ist. Wichtig ist dabei zum einen, daß die Rückreaktion des ersten Schrittes, d.h. der Wiedereintritt deacylierter tRNA

in die P-Stelle, verhindert wird. Beim nicht-enzymatischen Ablauf geschieht dies durch die Bindung von Aminoacyl-tRNA in die A-Stelle und anschließenden Peptidtransfer; unter der Katalyse von EF-G ist diese Voraussetzung bereits durch die Hydrolyse von GTP nach Translokation erfüllt. Eine zweite wichtige Erfordernis bei einer derartigen Reaktionsfolge ist durch die im Vergleich zur P-Stelle geringere Affinität und wesentlich höhere Labilität der tRNA-Bindung in der E-Stelle gegeben. Die Verschiebung der Peptidyl-tRNA von der A- in die P-Stelle und der synchrone Transfer der deacylierten tRNA von der P- in die E-Stelle kann nämlich nach dem Verhältnis der Bindungskonstanten spontan erfolgen (Tab. 2 und 3). Der Vorgang hat im übrigen zur Folge, daß die tRNA von einem Bereich hoher Stabilität in einen Bereich hoher Labilität verschoben wird. Die Spezifität der E-Stelle für deacylierte tRNA garantiert überdies, daß unter physiologischen Bedingungen der Wiedereintritt in diese Bindungsstelle durch die Aminoacylierung verhindert ist, also auch diese Reaktion als irreversibel betrachtet werden kann. Darüberhinaus ist unmittelbar einsehbar, daß der in einer Zelle vorliegende ungefähr zehnfache Überschuß von tRNA über Ribosomen (Gouy & Grantham, 1980) zu einer Blockierung der E-Stelle und damit zumindest zu einer Verlangsamung der Proteinsynthese führen würde.

Nach den hier dargelegten Überlegungen kann man die E-Stelle als einen isolierbaren Übergangszustand für die austretende deacylierte tRNA auffassen. Der Vorteil einer Ribosomen-gebundenen Zwischenstufe liegt vor allem in einer Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit des Gesamtprozesses, was natürlich einen bedeutenden Selektionsvorteil darstellt und zur Konservierung der E-Stelle beigetragen haben könnte.

3.3. Kontaktstellen des tRNA-Moleküls bei der Bindung an Ribosomen

Über die Natur der Wechselwirkung zwischen tRNA und den ribosomalen Bindungsstellen ist auf molekularer Ebene wenig bekannt. Bisher konnte mit Hilfe verschiedener Techniken lediglich größeren Bereichen des tRNA-Moleküls eine funktionelle Bedeutung bei der Bindung an Ribosomen zugeordnet werden. So bindet z.B. die Anticodonregion sowohl in der A- als auch in der P-Stelle nahe der ribosomalen Oberfläche (s. Ofengand, 1980). Die aus Affinitätsmarkierungen erhaltenen Befunde machen eine Codon-Anticodon-Wechselwirkung in diesen beiden Bindungsstellen sehr wahrscheinlich, eine Vorstellung, die ja auch durch die hier vorgelegten Daten unterstützt wird (2.3.6.). Die Dihydrouridinschleife dagegen ist nach Fluoreszenzmessungen sowohl in der P- als auch A-Stelle vermutlich nicht Ribosomen-gebunden, sondern zeigt vom Ribosom weg (Robertson & Wintermeyer, 1981). Für die konservierte TΨCG-Sequenz einer tRNA wurde kürzlich eine für die Bindung in die A-Stelle wichtige Basenpaarung mit der 16S RNA der kleinen ribosomalen Untereinheit vorgeschlagen (Helk & Sprinzl, 1985).

Bei der tRNA-Bindung in die E-Stelle, für die bisher noch keine strukturellen Informationen vorliegen, sind zumindest zwei Bereiche des tRNA-Moleküls wichtig: Von besonderer Bedeutung ist das 3'-Ende, was schon aus der Spezifität der E-Stelle für deacylierte tRNA hervorgeht, einer Eigenschaft, der sehr wahrscheinlich funktionelle Bedeutung für den Ablauf der Proteinbiosynthese zukommt (s. 3.2.). Der Einfluß des Akzeptorendes geht zudem aus der Beobachtung hervor, daß tRNA nach Abspaltung des 3'-termina-

len Adenosins mindestens zehnfach schwächer in die E-Stelle bindet (2.4.4.), was auf die Beteiligung dieses Nukleotids am Kontakt mit der E-Stelle hindeutet.

Eine mögliche zweite Kontaktstelle stellt nach Untersuchungen zur Bindung falsch-kodierter tRNAs in die E-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen der Anticodonbereich einer tRNA dar (2.4.3.). Diese Schlußfolgerung wurde aus der Tatsache abgeleitet, daß für jede der neun untersuchten, falsch-kodierten tRNAs eine charakteristische Affinität der Bindung in die E-Stelle existiert und diese korrelierbar ist mit dem Grad der Homologie zur Basensequenz des Anticodonstammes der tRNA^{Phe} aus *E. coli*. Die Komplexbildung zweier Makromoleküle setzt sich aus einer Vielzahl von molekularen Interaktionen zusammen; durch geringfügige Variationen der Struktur eines der Komplexpartner, z.B. durch die Sequenzheterogenität des Anticodonstammes der verschiedenen tRNAs, können einige Kontaktpunkte verloren gehen oder neu entstehen. Daher sind solche Unterschiede nicht erstaunlich und auch für die anderen tRNA-Bindungsstellen zu erwarten. Für die Wechselwirkung verschiedener Aminoacyl-tRNAs mit EF-Tu·GTP wurden solche Variationen der Bindungsstärke schon beobachtet (Pingoud & Urbanke, 1980; Louie et al., 1985).

Für das Ribosom ist bisher eine Unterscheidung aufgrund anderer Merkmale als der Codon-Anticodon-Wechselwirkung nur für die Bindung von Initiator- und Elongator-tRNA^{Met} in die A-Stelle beschrieben (Schmitt et al., 1981). Anhand von Untersuchungen der Nukleasesensitivität der Anticodonschleife dieser tRNAs schlossen Wrede et al. (1979a; 1979b), daß drei konservierte GC-Paare im Anticodonstamm (benachbart zur Anticodonschleife) in Initiator-tRNAs verschiedener Organismen eine veränderte Tertiärstruktur

dieses tRNA-Bereiches verursachen. Die Autoren schlugen vor, daß das Ribosom diese Konformationsveränderung zur Unterscheidung dieser tRNAs von Elongator-tRNA^{Met} benutzen könnte. Für den hier untersuchten Fall wäre in analoger Weise denkbar, daß eine bestimmte Basensequenz im Anticodonstamm eine Änderung der Konformation in der Anticodonschleife induziert und somit zum unterschiedlichen Bindungsverhalten in der E-Stelle führt. Alternativ dazu ist auch möglich, daß Details der Feinstruktur des RNA-Doppelstranges im Anticodonstamm erkannt werden, ähnlich wie dies z.B. bei der Bindung der Restriktionsendonuklease EcoRI an DNA der Fall ist (Frederick et al., 1984).

4. THEORETISCHER TEIL

4.1. Auswertung der Titrationskurven

Ribosomen besitzen zwei Bindungsstellen für beladene und drei für unbeladene tRNA. Ohne zusätzliche Informationen über das Bindungsverhalten, d.h. über die Reihenfolge der Besetzung, die Stabilität der Bindung und über Wechselwirkungen zwischen den Bindungsstellen, ist es zunächst nur möglich, sog. stöchiometrische ("makroskopische") Bindungskonstanten (Klotz, 1974; Klotz & Hunston, 1975) zu bestimmen; solche Parameter geben zwar an, mit welchen Affinitäten die erste, zweite und dritte tRNA an das Ribosom binden, ohne jedoch die einzelnen Bindungsstellen unterscheiden zu können. Natürlich ist die Kenntnis sog. stellenspezifischer ("mikroskopischer") Bindungskonstanten (Klotz, 1974; Klotz & Hunston, 1975), welche die Besetzung einer bestimmten Bindungsstelle mit tRNA beschreiben, von weit größerem Interesse (Ackers et al., 1983). Um solche Parameter direkt aus Gleichgewichtstitrationen entnehmen zu können, werden im folgenden Modelle für die Bindung verschiedener tRNA-Arten an ihre jeweiligen ribosomalen Bindungsstellen aufgestellt. Formal gesehen ermöglichen diese Modelle zusammen mit der weiter unten beschriebenen Methode der spezifischen Blockierung einzelner Bindungsstellen eine Vereinfachung des vorliegenden Problems auf die Analyse zweier bzw. dreier Einzelbindungsstellen.

4.1.1. Bindungsmodell für die ribosomalen tRNA-Bindungsstellen

Zur Aufstellung des Bindungsmodells für die tRNA-Bindung an Ribosomen wurde von folgenden biochemischen Befunden Gebrauch gemacht, die im Teil 2 dieser Arbeit ("Ergebnisse") belegt sind:

1) Die P-Stelle wird zuerst und unabhängig von der A- und E-Stelle besetzt. 2) A- und E-Stelle werden unabhängig voneinander besetzt. 3) Mit tRNA^{Phe} aus Hefe werden auch die A- und E-Stelle sequentiell besetzt. 4) Die tRNA-Bindung in die P- und A-Stelle ist sehr stabil.

Die P-Stelle wird zuerst und unabhängig von der A- und E-Stelle besetzt: Wie schon deGroot et al. (1971) und Watanabe (1972) zeigen konnten, wird auf Poly(U)-programmierten Ribosomen zuerst die P-Stelle mit tRNA besetzt. Auch aus den Abb. 4 und 6 wird ersichtlich, daß unabhängig von der tRNA-Art eine signifikante Besetzung der anderen Bindungsstellen erst nach dem Auffüllen der P-Stelle erfolgt. Besonders deutlich wird dieses Verhalten an der enzymatischen Bindung von Phe-tRNA^{Phe}. Der ternäre Komplex Phe-tRNA^{Phe}·EF-Tu·GTP bindet nicht in die A-Stelle von Ribosomen, deren P-Stelle frei ist, d.h. zumindest für die enzymatische Bindung in die A-Stelle scheint die Wechselwirkung mit der in der P-Stelle gebundenen tRNA und/oder eine Konformationsänderung des Ribosoms bei Besetzung der P-Stelle eine Voraussetzung für die Zugänglichkeit der A-Stelle zu sein.

Das sequentielle Bindungsverhalten läßt sich nur teilweise mit den verschiedenen Affinitäten der tRNA-Bindung in die P-Stelle einerseits und in die beiden anderen Bindungsstellen andererseits erklären. Von wesentlicherer Bedeutung scheinen die sehr unterschiedlichen Bindungs- und Dissoziationsgeschwindig-

keiten der tRNA in den drei ribosomalen Bindungsstellen zu sein. Während tRNA an die P- und E-Stelle innerhalb von Sekunden bindet (Wintermeyer & Robertson, 1982; Wintermeyer et al., 1985a), benötigt die nicht-enzymatische Bindung in die A-Stelle je nach Mg^{2+} -Konzentration mehrere Minuten bis Stunden (s. 2.2.1.). Betrachtet man die Stabilitäten der Bindung, so sind sich hier die P- und A-Stelle mit Halbwertszeiten der Dissoziation im Bereich von mehreren Stunden (s. 2.2.2.) sehr ähnlich; aus der E-Stelle hingegen dissoziiert die tRNA innerhalb von wenigen Sekunden (Wintermeyer et al., 1985a).

Dies hat für das Bindungsmodell die wichtige Konsequenz, daß die P-Stelle unabhängig von der A- und E-Stelle äquilibriert. Dabei ist für die Reihenfolge der Besetzung der P- und A-Stelle die Geschwindigkeit der Hinreaktion entscheidend: die P-Stelle befindet sich schon nach wenigen Sekunden vollständig im Gleichgewicht, während die A-Stelle noch nicht merklich gefüllt ist. Da die Dissoziation aus der P-Stelle sehr langsam ist, steht für die A-Stelle nur tRNA zur Verfügung, die nicht in die P-Stelle gebunden ist. Für die P- und E-Stelle andererseits scheint die Rückreaktion, d.h. die Stabilität der Bindung maßgeblich. Kinetische Experimente zeigten, daß tRNA^{Phe} zwar transient in die E-Stelle unbesetzter Ribosomen bindet, sich dann aber schnell in die P-Stelle umlagert (Wintermeyer et al., 1985a). Offensichtlich verhält sich die in der E-Stelle gebundene tRNA wegen der Labilität ihrer Bindung bezüglich der leeren P-Stelle wie freie tRNA. Zusammenfassend betrachtet ist die tRNA-Bindung an Ribosomen kinetisch kontrolliert. Die P-Stelle wird zuerst und unabhängig von den beiden anderen Bindungsstellen äquilibriert; erst danach erfolgt eine merkliche Besetzung der A- und E-Stelle.

Mit diesen Informationen läßt sich das allgemeine Bindungsschema für zwei bzw. drei Bindungsstellen (vgl. Klotz & Hunston, 1979) beträchtlich vereinfachen. In Gleichung 1 ist dies für das Bindungssystem von N-AcPhe-tRNA^{Phe}, N, mit ihren beiden Bindungsstellen, P und A, auf Poly(U)-programmierten Ribosomen, R, dargestellt (K: Gleichgewichtskonstante der Assoziation). In ähnlicher Weise erhält man für deacylierte tRNA^{Phe}, T, und ihre drei ribosomalen Bindungsstellen P, A und E das Reaktionsschema 2.



A- und E-Stelle werden unabhängig voneinander besetzt: Eine Vereinfachung des Schemas 2 ergibt sich aus der Tatsache, daß zwischen der A- und E-Stelle keine Wechselwirkung besteht. Dies geht aus der Beobachtung hervor, daß die Besetzung der A-Stelle mit N-AcPhe-tRNA^{Phe} keinerlei Einfluß auf die in der E-Stelle gebundene Menge an tRNA^{Phe} hat (Wintermeyer et al., 1985b). A- und E-Stelle können damit als unabhängig betrachtet werden, d.h. K_A und K_A' bzw. K_E und K_E' können gleichgesetzt werden.

Mit tRNA^{Phe} aus Hefe werden auch die A- und E-Stelle sequentiell besetzt: Für deacylierte tRNA^{Phe} aus Hefe kann man auch hinsichtlich der Bindung in die A- und E-Stelle ein sequentielles

Verhalten annehmen (s. Abb. 6). Wegen der ausgeprägten Labilität der E-Stellenbindung erscheint die hier gebundene tRNA^{Phe} auch für die A-Stelle wie ungebundene tRNA , d.h. die A-Stelle wird unabhängig von der E-Stelle äquilibriert. Somit kann die Bindung der unbeladenen tRNA^{Phe} aus Hefe durch ein Modell beschrieben werden, in dem die Besetzung in der Reihenfolge P-, A- und E-Stelle erfolgt (Gl. 3).

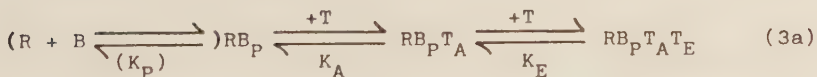
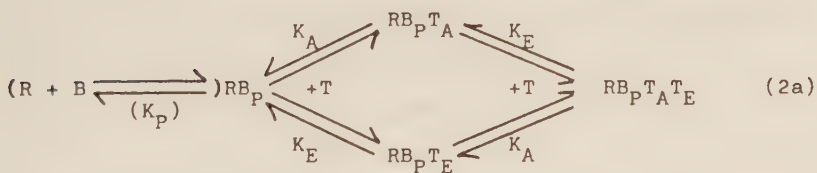
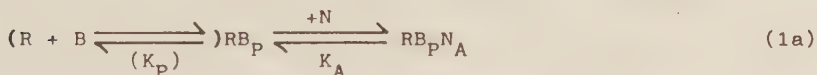


4.1.2. Durchführung der Gleichgewichtstitrationen

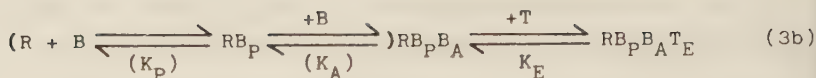
Prinzipiell ist es unter Verwendung der Reaktionsgleichungen 1-3 nun möglich, die stellenspezifischen Bindungskonstanten für jede Bindungsstelle zu bestimmen. Jedoch besitzen die P-, A- und E-Stelle recht unterschiedliche Affinitäten für tRNA . Da aus technischen Gründen (Vermeidung eines zu hohen tRNA -Überschusses, günstigstes Signal/Rausch-Verhältnis, nur geringe Probleme mit unspezifischer Bindung etc.; Pesce et al., 1971) Gleichgewichtstitrationen am genauesten bei Konzentrationen im Bereich der Dissoziationskonstanten ($c_{\text{R}_0} \approx 1/K$) durchgeführt werden, ist es unmöglich, alle Bindungskonstanten in einer einzigen Titration mit vergleichbarer Präzision zu bestimmen (Munson, 1983).

Das Problem wurde dadurch umgangen, daß zunächst die Affinitäten der schwächeren Bindungsstellen bestimmt wurden. Dabei wurde von der Möglichkeit Gebrauch gemacht, daß bei der hierzu

nötigen hohen Ribosomenkonzentration die stärkeren Bindungsstellen spezifisch mit unmarkierter tRNA blockiert werden können (s. 2.2.). So wird z.B. die A-Stelle nach Blockierung der P-Stelle einer separaten Untersuchung mit N-AcPhe-tRNA^{Phe} zugänglich, d.h. das Problem vereinfacht sich auf die Analyse einer einzelnen Bindungsstelle (Gl. 1a; B: blockierende tRNA). Analog dazu ergeben sich für deacylierte tRNA^{Phe} und den speziellen Fall der tRNA^{Phe} aus Hefe Systeme mit nur noch zwei zu analysierenden Bindungsstellen (Gl. 2a und 3a).



Mit deacylierter tRNA^{Phe} aus Hefe oder N-AcPhe-tRNA^{Phe} lassen sich die P- und A-Stelle gleichzeitig blockieren (s. 2.2.). Diese Tatsache erlaubt es, auch die Eigenschaften der E-Stelle unabhängig von den anderen Bindungsstellen zu studieren (Gl. 3b).



Schließlich wurden die stärkeren Bindungsstellen in separaten Titrations untersucht. Bei der hierfür optimalen, niedrigen Ribosomenkonzentration ist die Besetzung der schwächeren Bindungsstellen zwar gering, aber zumindest bei größerem tRNA-Überschuß nicht mehr zu vernachlässigen. Deshalb wurde ihr Anteil an der Gesamtbindung unter Zuhilfenahme ihrer zuvor bestimmten Affinitäten in die Analyse der stärkeren Bindungsstellen einbezogen. Die notwendigen Formalismen werden im folgenden abgeleitet für die Bindungssysteme mit einer (Gl. 1, 2a und 3a) bzw. zwei (Gl. 2 und 3) schwächeren Bindungsstellen. Zunächst wird die Auswertung der Bindungskonstanten für eine einzelne Bindungsstelle beschrieben.

4.1.3. Modell für eine Bindungsstelle

Dieses Modell kann auf alle Fälle angewendet werden, in denen nur eine ribosomale tRNA-Bindungsstelle zugänglich ist, also z.B. für die Bindung deacylierter tRNA^{Phe} in die E-Stelle nach Blockierung der P- und A-Stelle (s. Schema 3b) oder für die Untersuchung der A-Stelle mit beladener tRNA bei blockierter P-Stelle (s. Schema 1a). Das Massenwirkungsgesetz für die Assoziation der beiden Reaktionspartner, R und T, ist in Gl. 4 wiedergegeben.

$$K = \frac{c_{RT}}{c_R \cdot c_T} \quad (4)$$

Da in den Gleichgewichtstitrationen die Komplexkonzentration, c_{RT} , in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration an zugegebener tRNA, c_{T^0} , bestimmt wird, muß Gl. 4 geeignet umgeformt werden (Winkler-Oswatitsch & Eigen, 1979). In Gl. 5 ist zusätzlich der Bindungsgrad, n , eingeführt, der den Quotienten aus c_{RT} und der Gesamtkonzentration an Ribosomen, c_{R^0} , angibt.

$$n(c_{T^0}) = (L - (L^2 - 4 \cdot c_{T^0} \cdot c_{R^0})^{1/2}) / (2 \cdot c_{R^0}) \quad (5)$$

$$\text{mit } L = c_{T^0} + c_{R^0} + 1/K$$

$$\text{und } n(c_{T^0}) = c_{RT} / c_{R^0}$$

Das zur Messung der Komplexkonzentration benutzte Signal, I , ist nach Gl. 6 mit dem Bindungsgrad n verknüpft. $I_{\max}$ steht für das Signal bei vollständiger Besetzung der Bindungsstelle und ist bezogen auf I_B , dem Blindwert der Messung in Abwesenheit von tRNA.

$$I(c_{T^0}) = I_{\max} \cdot n(c_{T^0}) + I_B \quad (6)$$

Unter Verwendung eines Iterationsverfahrens zur nicht-linearen Anpassung nach Gauss-Newton (Graybill, 1969) wurde diese Beziehung zur Berechnung der Gleichgewichtskonstanten, K , benutzt. Optimale Ergebnisse wurden erzielt, wenn neben K auch $I_{\max}$ und I_B angepaßt wurden. Durch die Einbeziehung von $I_{\max}$ in das Iterationsverfahren konnte die experimentelle Bestimmung von $I_{\max}$ bei hohem tRNA-Überschuß vermieden werden. Der durch die Streuung der Originaldaten verursachte Fehler für die drei angepaßten Parameter war kleiner als $\pm 10\%$.

4.1.4. Modell für die sequentielle Besetzung zweier Bindungsstellen

Dieses Modell dient zur Auswertung der Bindungskonstanten der stärkeren von zwei Bindungsstellen und soll am Beispiel der Bindung von N-AcPhe-trRNA^{Phe} in die P- und A-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen (s. Schema 1) beschrieben werden. Analog dazu ist es auch zur Auswertung der Titrationsen der A- und E-Stelle mit trRNA^{Phe} aus Hefe bei blockierter P-Stelle (s. Schema 3a) geeignet.

Da nach dem oben aufgestellten Bindungsmodell (s. 4.1.1.) die trRNA-Bindung in die P-Stelle zuerst und unabhängig von den anderen Bindungsstellen äquilibriert, kann Gl. 5 zur Berechnung des Besetzungsgrades der P-Stelle verwendet werden (hier ist $n_P = n$, $K_P = K$). Für die Bindung in die A-Stelle steht dann nicht mehr die gesamte trRNA-Konzentration, c_{T_0} , zur Verfügung, sondern nur noch der nicht in die P-Stelle gebundene Anteil der trRNA, c_{TA} (Gl. 7).

$$c_{TA}(c_{T_0}) = c_{T_0} - n_P(c_{T_0}) * c_{R_0} \quad (7)$$

Die Besetzung der A Stelle, n_A , errechnet sich analog zu Gl. 5, wobei die Einführung von c_{RP} (anstelle von c_{R_0}) in Gl. 5a ferner berücksichtigt, daß die A-Stelle nur auf Ribosomen, die eine trRNA in der P-Stelle tragen, besetzt werden kann (s. 4.1.1.). Wegen der ohnehin höheren Affinität der P-Stelle ist der Unterschied zwischen c_{R_0} und c_{RP} jedoch gering.

$$n_A(c_{T_0}) = (M - (M^2 - 4 \cdot c_{TA}(c_{T_0}) \cdot c_{RP}(c_{T_0}))^{1/2}) / (2 \cdot c_{RP}(c_{T_0})) \quad (5a)$$

$$\text{mit } M = c_{TA}(c_{T_0}) + c_{RP}(c_{T_0}) + 1/K_A$$

$$\text{und } c_{RP}(c_{T_0}) = n_P(c_{T_0}) \cdot c_{R_0}$$

Falls die Signalintensitäten für die Bindung in die P- und A-Stelle ununterscheidbar sind, ist das resultierende Gesamtsignal, I_{PA} , proportional zur Summe der einzelnen Bindungsgrade, $n_P + n_A$. Dies gilt z.B. für die Titration mit radioaktiver N-Ac(^{14}C)Phe-tRNA^{Phe}, da die P- und A-Stelle die gleiche Bindungsaktivität aufweisen (s. 2.1.1.). In Fluoreszenztitrationen hingegen sind die Quantenausbeuten fluoreszierender tRNA in beiden Bindungsstellen nicht notwendigerweise identisch; darüberhinaus kann ein Singulett-Singulett-Energietransfer zwischen zwei gleichzeitig am Ribosom gebundenen tRNAs stattfinden (Fairclough & Cantor, 1979; Johnson et al., 1982; Paulsen et al., 1983), der dazu führt, daß das Gesamtsignal geringer als die Summe der Einzelsignale ist. Der unterschiedliche Beitrag der beiden Bindungsstellen zum Gesamtsignal, I_{PA} , wird in Gl. 6a durch die Einführung eines Intensitätsfaktors, q, berücksichtigt, der das Signalverhältnis A- und P-Stellen-gebundener tRNA angibt ($I_{\max} = I_{\max}^P$).

$$I_{PA}(c_{T_0}) = I_{\max} \cdot (n_P(c_{T_0}) + n_A(c_{T_0}) \cdot q) + I_B \quad (6a)$$

$$\text{mit } q = I_{\max}^A / I_{\max}$$

Der Wert von q kann aus einer stöchiometrischen Titration beider Bindungsstellen ($c_{R_0} \gg K_A$) bestimmt werden: Dazu wird $I_{\max}$ aus der Signaldifferenz bei einem tRNA/Ribosomenverhältnis von 1 und 0 abgelesen, $I_{\max}^A$ entspricht dem restlichen Signal bis zum

Plateau. Da K_A aus einer entsprechenden Titration der A-Stelle bei blockierter P-Stelle bekannt ist, müssen wie im Abschnitt 4.1.3. nur die Parameter K_P , $I_{\max}$ und I_B angepaßt werden.

4.1.5. Modell für die sequentielle Besetzung dreier Bindungsstellen

Zur Auswertung der Bindungskonstanten der P-Stelle für deacylierte tRNA^{Phe} aus Hefe muß in Ergänzung zum eben beschriebenen Formalismus noch die Bindung in die E-Stelle berücksichtigt werden (vgl. Schema 3 mit 3a). Die Gleichungen 5, 7 und 5a können daher übernommen und der für die Bindung in die E-Stelle verbliebene Anteil freier tRNA, c_{TE} , nach Gl. 7a berechnet werden. Der Besetzungsgrad der E-Stelle, n_E , folgt dann aus Gl. 5b.

$$c_{TE}(c_{T_0}) = c_{T_0} - (n_P(c_{T_0}) + n_A(c_{T_0})) \cdot c_{R_0} \quad (7a)$$

$$n_E(c_{T_0}) = (N - (N^2 - 4 \cdot c_{TE}(c_{T_0}) \cdot c_{RA}(c_{T_0}))^{1/2} / (2 \cdot c_{RA}(c_{T_0})) \quad (5b)$$

$$\text{mit } N = c_{TE}(c_{T_0}) + c_{RA}(c_{T_0}) + 1/K_E$$

$$\text{und } c_{RA}(c_{T_0}) = n_A(c_{T_0}) \cdot c_{R_0}$$

Schließlich läßt sich das Gesamtsignal, I_{PAE} , als Summe der einzelnen Bindungsgrade unter Berücksichtigung der jeweiligen Intensitätsfaktoren, q_A und q_E , angeben (Gl. 6b).

$$I_{PAE}(c_{T_0}) = I_{\max} \cdot (n_P(c_{T_0}) + n_A(c_{T_0}) \cdot q_A + n_E(c_{T_0}) \cdot q_E) + I_B \quad (6b)$$

$$\text{mit } q_A = I_{\max}^A / I_{\max} \quad \text{und} \quad q_E = I_{\max}^E / I_{\max}$$

Wie in den vorhergehenden Abschnitten werden K_P , $I_{\max}$ und I_B durch nicht-lineare Anpassung bestimmt, $I_{\max}^A$ und $I_{\max}^E$ sind aus einer stöchiometrischen Titration aller drei Bindungsstellen ($c_{R^0} \gg 1/K_E$) abzulesen, und K_A und K_E werden aus entsprechenden Titrationen der A- und E-Stelle bei blockierter P- (und A-)Stelle entnommen.

4.1.6. Bestimmung stöchiometrischer Bindungskonstanten

Abschließend soll die Bestimmung stöchiometrischer Bindungskonstanten bei Vorliegen zweier Bindungsstellen beschrieben werden (vgl. Klotz, 1983). Wie schon erwähnt, ist ohne die Kenntnis des Bindungsverhaltens nur diese Art der Auswertung möglich. Die stöchiometrischen Bindungskonstanten, K_1 und K_2 , geben unabhängig vom Ort der Bindung an, mit welcher Affinität die erste bzw. zweite tRNA an das Ribosom bindet. Der Bindungsgrad, r , wird hier definiert als die Konzentration gebundener tRNA, c_{Tb} , pro Gesamtkonzentration an Ribosomen, c_{R^0} , und beschreibt, im Gegensatz zu n , gleichzeitig die Besetzung beider ribosomaler Bindungsstellen mit tRNA. Gl. 8 korreliert r mit der freien tRNA-Konzentration, c_T (genaue Herleitung s. Klotz, 1974).

$$r(c_{T^0}) = \frac{K_1 \cdot c_T(c_{T^0}) + 2 \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot c_T^2(c_{T^0})}{1 + K_1 \cdot c_T(c_{T^0}) + K_1 \cdot K_2 \cdot c_T^2(c_{T^0})} \quad (8)$$

$$\text{mit } r(c_{T^0}) = c_{Tb}(c_{T^0})/c_{R^0}$$

Schließlich werden durch Gl. 9 das beobachtete Meßsignal, I_{12} , und der Bindungsgrad, r , analog zu Gl. 6-6b verknüpft.

$$I_{12}(c_{T_0}) = I_{\max} * r(c_{T_0}) + I_B \quad (9)$$

Mit dieser Beziehung wurden die beiden stöchiometrischen Bindungskonstanten, K_1 und K_2 , zusammen mit $I_{\max}$ und I_B durch das oben beschriebene Iterationsverfahren bestimmt. Im Unterschied zum Gleichungstyp 6 ist das Meßsignal hier nicht direkt von der Gesamtkonzentration, c_{T_0} , sondern von der freien tRNA-Konzentration, c_T , abhängig. c_T kann zwar nach Gl. 10 aus c_{T_0} berechnet werden, jedoch ist darin auch $I_{\max}$, ein anzupassender Parameter, enthalten.

$$c_T(c_{T_0}) = c_{T_0} - I_{12}(c_{T_0}) * c_{R_0} / I_{\max} \quad (10)$$

Die Komplikation wurde durch eine Berechnung der vier Parameter in mehreren Iterationsschleifen bewältigt. Für den ersten Durchgang wurde $I_{\max}$ aus der Titrationskurve abgeschätzt, für alle weiteren der Endwert aus der jeweils letzten Schleife benutzt. Die Berechnung wurde abgebrochen, wenn die relative Änderung von $I_{\max}$ kleiner als 10^{-3} war.

Die eben beschriebene Auswertungsmethode findet Anwendung für die Bindung deacylierter tRNA^{Phe} aus E. coli in die A- und E-Stelle Poly(U)-programmierter, P-Stellen-blockierter Ribosomen (Gl. 2a) sowie für die Bindung deacylierter tRNA^{Phe} in die P- und E-Stelle unprogrammierter Ribosomen. In beiden Fällen ist eine sequentielle Bindung nicht ersichtlich. Jedoch kann man annehmen, daß keine Wechselwirkung zwischen den beiden Bindungsstellen existiert (Wintermeyer et al., 1985b). Unter dieser Voraussetzung

lassen sich aus den stöchiometrischen (K_1 und K_2) die stellenspezifischen Bindungskonstanten, K_I und K_{II} , für die Bindungsstellen I und II ableiten (Klotz, 1974):

$$K_{I(II)} = K_1/2 (\pm) (K_1^2/4 - K_1 \cdot K_2)^{1/2} \quad (11)$$

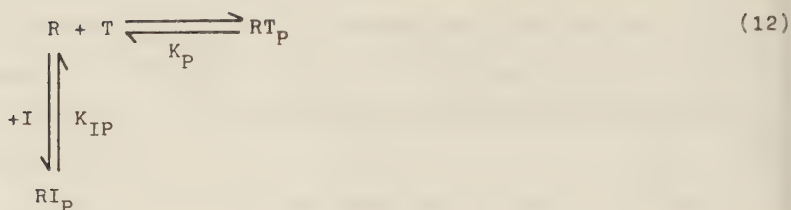
Die Bedingung $K_1 = 4 \cdot K_2$ stellt einen Sonderfall dar: Die Quadratwurzel wird Null und damit $K_I = K_{II}$. Die beiden Bindungsstellen besitzen also identische Affinitäten, wenn die stöchiometrischen Gleichgewichtskonstanten um Faktor vier differieren (Cantor & Schimmel, 1980).

4.2. Auswertung des Indikatorbindungstests

Der Indikatorbindungstest der P- und A-Stelle ist in anderen Teilen dieser Arbeit detailliert beschrieben (2.1.1. und 5.2.3.). In diesem Kapitel werden die zur Auswertung der sigmoiden Titrationskurven benötigten Formeln abgeleitet. Dazu wird wieder das in 4.1.1. beschriebene Bindungsmodell zugrundegelegt.

4.2.1. Indikatorbindungstest der P-Stelle

Mit dieser Methode wurde die Aktivität der Ribosomen für die Bindung von tRNA^{Phe} oder $\text{N-AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ in die P-Stelle bestimmt. Das Reaktionsschema ist in Gl. 12 wiedergegeben.



Zunächst werden Poly(U)-programmierte Ribosomen, R, mit steigenden Mengen tRNA, T, versetzt; in einem zweiten Schritt wird eine geringe Menge Indikator-tRNA, I (N-AcPhe-tRNA^{Phe}), zugegeben und die noch unbesetzten P-Stellen mit der Puromycin-reaktivität gebundener N-AcPhe-tRNA^{Phe} analysiert. Die mögliche Besetzung der A- und E-Stelle mit tRNA ist in diesem Zusammenhang ohne Belang. Wegen der beträchtlichen Stabilität der tRNA-Bindung in die P-Stelle wird die Gleichgewichtslage der ersten Reaktion während der Dauer des Experiments durch die Zugabe der Indikator-tRNA nicht merklich gestört (s. 2.2.2.) und kann deshalb durch Gl. 5 (mit $n_P = n$ und $K_P = K$) beschrieben werden. Für die Bindung der Indikator-tRNA steht dann nur die Konzentration noch unbesetzter P-Stellen, c_{UP} , zur Verfügung und läßt sich nach Gl. 13 ermitteln.

$$c_{UP}(c_{T_0}) = (1 - n_P(c_{T_0})) \cdot c_{R_0} \quad (13)$$

Da im zweiten Titrationsschritt die Menge an freien P-Stellen variiert, während die Konzentration an Indikator-tRNA, c_{I_0} , konstant bleibt, ist es günstig, den Bindungsgrad der Indikator-tRNA in der P-Stelle, n_{IP} , bezüglich c_{I_0} (anstatt c_{R_0}) zu definieren. n_{IP} berechnet sich analog zum Gleichungstyp 5 nach Gl. 14.

$$n_{IP}(c_{T^0}) = (Q - (Q^2 - 4 \cdot c_{UP}(c_{T^0}) \cdot c_{I^0})^{1/2}) / (2 \cdot c_{I^0}) \quad (14)$$

$$\text{mit } Q = c_{I^0} + c_{UP}(c_{T^0}) + 1/K_{IP}$$

$$\text{und } n_{IP}(c_{T^0}) = c_{RI}/c_{I^0}$$

Gl. 15 korreliert n_{IP} schließlich mit dem beobachteten Meßsignal, I_{IP} (d.h. dem Puromycin-reaktiven Teil der Indikator-tRNA, N-AcPhe-tRNA^{Phe}).

$$I_{IP}(c_{T^0}) = I_{\max} \cdot n_{IP}(c_{T^0}) + I_B \quad (15)$$

$I_{\max}$ entspricht dem Signal bei vollständig gebundener Indikator-tRNA und ist bezogen auf I_B , den Blindwert der Messung. Zur Bestimmung der tRNA-Bindungsaktivität der P-Stelle nach Gl. 15 wurden die Parameter c_{R^0} sowie $I_{\max}$ und I_B mit dem nicht-linearen Regressionsverfahren nach Gauss-Newton (Graybill, 1969) angepaßt. Der Fehler durch die Streuung der Meßdaten lag üblicherweise unter 10%.

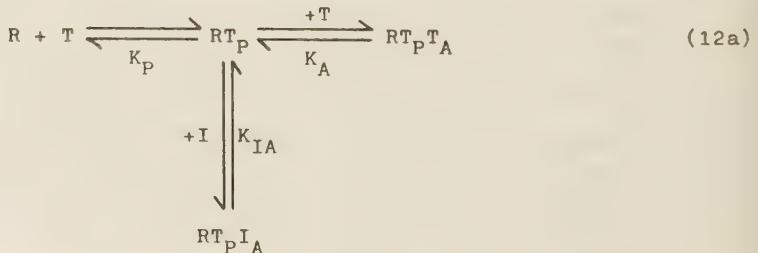
Die Bindungskonstanten K_P und K_{IP} wurden entsprechenden Gleichgewichtstitrationen nach Kapitel 4.1. entnommen. Selbstverständlich setzt die Bestimmung dieser Konstanten wieder die Kenntnis der Aktivität der Ribosomen voraus, d.h. die beiden Titrationsarten sind nicht unabhängig voneinander. Da jedoch die Aktivität der P-Stelle durch den Indikator-test am besten unter stöchiometrischen Bedingungen ermittelt wird, beeinflußt ein Fehler in den Affinitäten das Ergebnis nur geringfügig. Darüberhinaus wurde in weiteren Auswertungszyklen mit korrigierten Affinitäten solange ein genauerer Wert für c_{R^0} bestimmt, bis keine Veränderung mehr erfolgte.

4.2.2. Indikatorbindungstest der A-Stelle

Mit deacylierter tRNA^{Phe} aus Hefe oder mit N-AcPhe-tRNA^{Phe} wird die A-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen als zweite Bindungsstelle besetzt. Für deacylierte tRNA^{Phe} aus E. coli hingegen wurde kein sequentielles Bindungsverhalten der A- und E-Stelle beobachtet (s. 2.1.3.). Vielmehr scheinen die beiden Bindungsstellen nur nach Vorgabe ihrer Bindungskonstanten besetzt zu werden (Gl. 2a). Für beide Fälle ist deshalb ein unterschiedlicher Formalismus zur Auswertung des Indikatorbindungstests der A-Stelle nötig.

1. Fall: Die A-Stelle wird als zweite Bindungsstelle besetzt.

Die beiden Schritte der Indikator-titration der A-Stelle mit deacylierter tRNA^{Phe} aus Hefe oder N-AcPhe-tRNA^{Phe} sind im Reaktionsschema 12a formuliert. Die horizontale Zeile in Gl. 12a zeigt die Komplexbildung der zu untersuchenden tRNA mit Poly(U)-programmierten Ribosomen. Für die vertikal dargestellte, zweite Inkubation mit spezifisch in die A-Stelle bindender Indikator-tRNA (ternärer Komplex Phe-tRNA^{Phe}·EF·Tu·GTP) wurde gemäß dem Bindungsmodell (s. 4.1.1.) berücksichtigt, daß bei freier P-Stelle keine Besetzung der A-Stelle mit Indikator erfolgt.



Zur Berechnung des Besetzungsgrades der A-Stelle, n_A , können die Gl. 5, 7 und 5a, welche für die sequentielle tRNA-Bindung in die P- und A-Stelle abgeleitet wurden (s. 4.1.4.), benutzt werden. Analog zu Gl. 13 und 14 erhält man die Konzentration freier A-Stellen nach dem ersten Schritt, c_{UA} (Gl. 13a), und den Besetzungsgrad mit Indikator-tRNA, n_{IA} (Gl. 14a).

$$c_{UA}(c_{T^0}) = (1 - n_A(c_{T^0})) \cdot c_{R^0} \quad (13a)$$

$$n_{IA}(c_{T^0}) = (R - (R^2 - 4 \cdot c_{UA}(c_{T^0}) \cdot c_{I^0})^{1/2}) / (2 \cdot c_{I^0}) \quad (14a)$$

$$\text{mit } R = c_{I^0} + c_{UA}(c_{T^0}) + 1/K_{IA}$$

$$\text{und } n_{IA}(c_{T^0}) = c_{RI}/c_{I^0}$$

Damit läßt sich die Beziehung zum beobachteten Meßsignal, I_{IA} (gebundene Phe-tRNA^{Phe}), nach Gl. 15a herstellen.

$$I_{IA}(c_{T^0}) = I_{\max} \cdot n_{IA}(c_{T^0}) + I_B \quad (15a)$$

Wie in Abschnitt 4.2.1. beschrieben, wurden die Parameter c_{R^0} , $I_{\max}$ und I_B nach Gl. 15a durch nicht-lineare Regression bestimmt; die Bindungskonstanten K_P , K_A und K_{IA} wurden entsprechenden Gleichgewichtstitrationen nach Kapitel 4.1. entnommen.

2. Fall: Die A-Stelle wird gleichzeitig mit der E-Stelle besetzt. Zur Auswertung der Indikatortitration der A-Stelle mit tRNA^{Phe} aus E. coli kann der eben abgeleitete Formalismus trotz der Komplikation der gleichzeitigen Besetzung der A- und E-Stelle teilweise übernommen werden. Zunächst wird mit Gl. 5 und 7 die tRNA-Konzentration ($\hat{=} c_{TA}$) bestimmt, die nicht in die P-Stelle

gebunden ist, d.h. für die Bindung in die A- und E-Stelle zur Verfügung steht. Bei Kenntnis der stellenspezifischen Bindungskonstanten, K_A , läßt sich für Systeme mit mehreren Bindungsstellen der Bindungsgrad der A-Stelle, r_A , nach Gl. 16 formulieren (Klotz, 1974).

$$r_A(c_{T0}) = \frac{K_A * c_T(c_{T0})}{1 + K_A * c_T(c_{T0})} \quad (16)$$

Die freie tRNA-Konzentration, c_T , hängt aber von der Besetzung aller Bindungsstellen ab (Gl. 17) und muß in einer separaten Iteration aus der bekannten Gesamtkonzentration, c_{T0} , ermittelt werden. Als erster Näherungswert für c_T zur Berechnung der Bindungsgrade der A- und E-Stelle, r_A und r_E , nach Gl. 16 und 16a wird c_{TA} verwendet und mit Gl. 17 ein neuer Wert für c_T kalkuliert.

$$r_E(c_{T0}) = \frac{K_E * c_T(c_{T0})}{1 + K_E * c_T(c_{T0})} \quad (16a)$$

$$c_T(c_{T0}) = c_{T0} - (n_P(c_{T0}) + r_A(c_{T0}) + r_E(c_{T0})) * c_{R0} \quad (17)$$

Die Prozedur wird mit c_T als neuem Näherungswert wiederholt und solange fortgeführt, bis die relative Änderung an c_T kleiner als 10^{-3} wird. Mit dem nunmehr bekannten Bindungsgrad der A-Stelle, n_A , folgt die Konzentration noch unbesetzter A-Stellen, c_{UA} , aus Gl. 13b.

$$c_{UA}(c_{T^0}) = (1 - r_A(c_{T^0})) \cdot c_{R^0} \quad (13b)$$

Schließlich werden zur Berechnung der Besetzung der A-Stelle mit Indikator-tRNA wieder die Gleichungen 14a und 15a benutzt und die gesuchten Parameter, c_{R^0} , $I_{\max}$ und I_B wie beschrieben angepaßt. Da auch hier das gesamte Verfahren aus zwei Iterationen besteht (vgl. 4.1.6.), wird es solange wiederholt, bis sich keine wesentlichen Änderungen mehr ergeben.

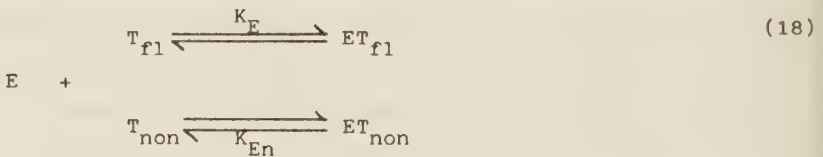
4.2.3. Der Indikatorbindungstest zur Bestimmung der Bindungskonstanten der A-Stelle

Wegen der sehr hohen Affinität des ternären Komplexes für die A-Stelle war der Indikatorbindungstest über die Analyse der tRNA-Bindungsaktivität, c_{R^0} , hinaus (vgl. 4.2.2.) auch eine geeignete Meßmethode zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der A-Stelle, K_A . Für diese Anwendung des Tests wurden die besten Ergebnisse erzielt, wenn die Konzentration an Indikator-tRNA nahezu stöchiometrisch zur (bekannten) Ribosomenkonzentration eingesetzt wurde; diese wurde im Bereich von $1/K_A$ gewählt. Zur Auswertung der Titrationskurven wurden die Parameter K_A sowie $i_{\max}$ und I_B durch nicht-lineare Anpassung (s.o.) mit der Gleichung 15a errechnet und die Gleichgewichtskonstanten K_P , K_{IA} (und K_E) entsprechenden Titrationen nach Kapitel 4.1. entnommen.

4.3. Bestimmung der Affinitäten der Bindung falsch-kodierter tRNAs in die ribosomale E-Stelle

Die E-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen kann auch mit falsch-kodierten tRNAs besetzt werden. Im Abschnitt 2.4.2. wurde die Bindung dieser tRNAs indirekt mit der Fluoreszenzmethode bestimmt und als Maß für die Bindungsstärke die Fluoreszenzänderung bei Zugabe von tRNA^{Phe}_{Prf16/20} relativ zum Signal bei freier E-Stelle benutzt. Im folgenden wird eine Auswertungsprozedur beschrieben, die es erlaubt, aus dieser Meßgröße die Bindungskonstanten für die Wechselwirkung der falsch-kodierten tRNAs mit der E-Stelle zu bestimmen.

Die Konkurrenz zwischen tRNA^{Phe}_{Prf16/20}, T_{f1}, und falsch-kodierter tRNA, T_{non}, um die E-Stelle, E, läßt sich nach dem Reaktionsschema 18 formulieren (E entspricht RB_PB_A in Gl. 3b).



Ähnlich wie in Gl. 5 ergibt sich der Besetzungsgrad der E-Stelle mit falsch-kodierter tRNA, n_n , in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration an falsch-kodierter tRNA, c_{Tn} , aus Gl. 19.

$$n_n(c_{Tn}) = (S - (S^2 - 4 \cdot c_{Tn} \cdot (c_{R0} - c_{Ef}(c_{Tn})))^{1/2}) / (2 \cdot c_{R0}) \quad (19)$$

$$\text{mit } S = c_{R0} - c_{Ef}(c_{Tn}) + c_{Tn} + 1/K_{En}$$

Die Konzentration gebundener, fluoreszierender tRNA, c_{Ef} , kann aus dem beobachteten Fluoreszenzsignal in An- und Abwesenheit von falsch-kodierter tRNA, I_n und I_{f0} , unter Benutzung von

Gl. 20 errechnet werden, wobei der Besetzungsgrad der E-Stelle mit $\text{tRNA}_{\text{Prf16/20}}^{\text{Phe}}$, m_{Ef} , erhalten wird aus Gl. 5 (mit $n = m_{\text{Ef}}$, $c_{\text{T}^0} = c_{\text{Tf}}$, $K = K_{\text{E}}$) und in diesem Fall günstigerweise auf die (konstant gehaltene) Konzentration an $\text{tRNA}_{\text{Prf16/20}}^{\text{Phe}}$, c_{Tf} , bezogen wird.

$$c_{\text{Ef}}(c_{\text{Tn}}) = c_{\text{Tf}} \cdot U \quad (20)$$

$$\text{mit } U = m_{\text{Ef}}(c_{\text{Tf}}) \cdot I_{\text{n}}(c_{\text{Tn}}) / I_{\text{f}^0}$$

Um K_{En} durch nicht-lineare Anpassung nach Gauss-Newton (Graybill, 1969) mit Gl. 19 bestimmen zu können, muß zunächst der Besetzungsgrad n_{n} , der ja nicht direkt gemessen wird, errechnet werden. Dies ist möglich durch Subtraktion des Teils an gebundener, fluoreszierender tRNA pro Ribosom, n_{Ef} , vom Besetzungsgrad der E-Stelle mit gesamter tRNA, n_{ges} (Gl. 21).

$$n_{\text{n}}(c_{\text{Tn}}) = n_{\text{ges}}(c_{\text{Tn}}) - n_{\text{Ef}}(c_{\text{Tn}}) \quad (21)$$

$$\text{mit } n_{\text{Ef}}(c_{\text{Tn}}) = c_{\text{Ef}}(c_{\text{Tn}}) / c_{\text{R}^0}$$

Unter Ausnutzung der Tatsache, daß der Besetzungsgrad der E-Stelle mit gesamter tRNA, n_{ges} , unabhängig davon ist, ob die E-Stelle mit tRNA^{Phe} oder mit falsch-kodierter tRNA als kompetierender tRNA besetzt ist, läßt sich n_{ges} mit Gl. 5 (mit $n = n_{\text{ges}}$, $c_{\text{T}^0} = c_{\text{sch}}$) behelfsweise für tRNA^{Phe} unter Benutzung der bekannten Bindungskonstanten, K_{E} , ermitteln. Die scheinbare Gesamtkonzentration an tRNA^{Phe} , c_{sch} , ergibt sich dabei aus Gl. 22, die aus dem Massenwirkungsgesetz abzuleiten ist.

$$c_{\text{sch}}(c_{\text{Tn}}) = c_{\text{R}^0} / U - 1 / (K_{\text{E}} \cdot (1 - U)) \quad (22)$$

5. MATERIALIEN UND METHODEN

5.1. Materialien

5.1.1. Ribosomen

70S Ribosomen (sog. "tight couple") aus *E. coli* MRE 600 wurden nach einer Variante der Methode von Noll et al. (1973) durch Zonal-Ultrazentrifugation isoliert (Robertson & Wintermeyer, 1981). Die tRNA-Bindungsaktivität wurde mit dem Indikatorbindungstest (s. 5.2.3.) bestimmt und betrug für verschiedene Präparationen 60-70%, bezogen auf einen Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{260} = 4.35 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (van Holde & Hill, 1974). Falls nicht besonders erwähnt, sind in dieser Arbeit Konzentrationen aktiver Ribosomen angegeben.

5.1.2. Nicht-aminoacylierte tRNAs

Nachstehende nicht-aminoacylierte tRNAs aus *E. coli* wurden von Boehringer Mannheim bezogen und waren wie folgt aminoacylierbar (in nmol Aminosäure/ A_{260} -Einheit): tRNA^{Phe} (1.2-1.5), tRNA^{Lys} (1.5), tRNA^{Met}_f (1.6), tRNA^{Val}₁ (1.4), tRNA^{Glu}₂ (1.4) und tRNA^{Tyr} (1.2). tRNA^{Gly} (1.1) sowie tRNA^{Leu} (1.2) aus *E. coli* waren ein Geschenk von H.G. Zachau. tRNA^{Phe} aus Brauereihefe-tRNA (Boehringer Mannheim) wurde nach Robertson & Wintermeyer (1981) isoliert und war mit 1.5-1.7 nmol Phe/ A_{260} -Einheit aminoacylierbar. tRNA^{Arg}₃ aus Brauereihefe (1.4) wurde von R. Thiebe zur Verfügung gestellt (Thiebe, 1983). tRNA^{Ser}_{1/2} aus Brauereihefe (1.2) wurde von L. Dibbelt präpariert (Pachmann & Zachau, 1978). tRNAs

mit verkürztem 3'-Ende ($\text{tRNA}^{\text{Phe}}(-\text{A})$ und $\text{tRNA}^{\text{Phe}}(-\text{ACCA})$ aus Hefe sowie $\text{tRNA}_{\text{f}}^{\text{Met}}(-\text{A})$ aus *E. coli*) waren von H. Paulsen hergestellt (Paulsen & Wintermeyer, 1984). tRNA-Konzentrationen wurden unter Berücksichtigung eines Extinktionskoeffizienten von

$$\epsilon_{260} = 5.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ (Guéron \& Leroy, 1978) berechnet.}$$

5.1.3. Aminoacylierte tRNA^{Phe}

Die Aminoacylierung und Acetylierung von tRNA^{Phe} aus *E. coli* und Hefe wurden nach veröffentlichten Prozeduren durchgeführt (Haenni & Chapeville, 1966; Rappoport & Lapidot, 1974; Robertson & Wintermeyer, 1981). Dabei wurden $(^{14}\text{C})\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ zu 1.2-1.4 nmol/ A_{260} -Einheit und N-Ac $(^{14}\text{C})\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ zu 1.4-1.7 nmol/ A_{260} -Einheit angereichert. Der Beladungszustand der tRNAs mit Aminosäure wurde mit Hilfe der TCA-Fällung (Lill, 1981; Thiebe, 1982) gemessen. Sofern nicht anders angegeben, betrug die spezifische Radioaktivität des (^{14}C) Phenylalanins 504 Ci/mol (Amersham Buchler, Braunschweig).

5.1.4. Proflavin-markierte tRNA^{Phe}

$\text{tRNA}_{\text{Prf16/17}}^{\text{Phe}}$ aus Hefe wurde nach Wintermeyer & Zachau (1979) dargestellt; $\text{tRNA}_{\text{Prf16/20}}^{\text{Phe}}$ aus *E. coli* wurde nach derselben Vorschrift präpariert. Die modifizierten tRNA^{Phe} -Moleküle tragen den fluoreszierenden Farbstoff Proflavin anstelle des Dihydrouracils in Position 16 und 17 bzw. 16 und 20. Beide tRNA^{Phe} -Derivate waren zu mindestens 1.2 nmol Phe/ A_{260} -Einheit beladbar. Wegen der Lichtempfindlichkeit des eingebauten Proflavins wurden die tRNAs weitgehend unter Lichtausschluß gehandhabt.

5.1.5. Präparation von (^{32}P)-markierter tRNA^{Phe}

Die radioaktive Markierung wurde durch einen Austausch des 5'-terminalen Phosphatrests in tRNA^{Phe} aus E. coli oder Hefe gegen (^{32}P)-Phosphat eingeführt. Zur Abspaltung des Phosphats wurden 5 A₂₆₀-Einheiten tRNA^{Phe} in 100 µl Tris·HCl, pH 8.0, mit 3 - 5 Einheiten alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (E.C. 3.1.3.1; Boehringer Mannheim) 45 min bei 50°C inkubiert. Nach viermaliger Phenolextraktion und anschließender Beseitigung des Phenols durch Ether wurde die tRNA mit Ethanol ausgefällt.

Die Rephosphorylierung wurde mit T4-Polynukleotidkinase (E.C. 2.7.1.78; Boehringer Mannheim) und (γ - ^{32}P)ATP (Walseth & Johnson, 1979) in 200 µl Puffer (25 mM Tris·HCl, pH 8.0, 5mM Dithiothreitol, 2 mM Spermin, 10 mM MgCl₂ und 10 µg/ml Rinderserumalbumin) bei 37°C durchgeführt (Richardson, 1969; 1981). In dieser Reaktion werden kleine tRNA-Fragmente, auch wenn sie nur in geringem Ausmaß vorhanden sind, bevorzugt markiert. Diese unerwünschte Reaktion, die wesentlich schneller als die Markierung intakter tRNA abläuft, wurde durch eine zweistufige Ausführung der Inkubation weitgehend unterdrückt: Zunächst wurde der Reaktionsansatz mit 20 Einheiten T4-Polynukleotidkinase und 3 nmol unmarkiertem ATP (ATP/tRNA = 0.3) 20 min inkubiert; dann wurden weitere 60 Einheiten des Enzyms und 18 nmol (γ - ^{32}P)ATP (ca. 0.1 mCi) zugegeben. Der Einbau von radioaktivem Phosphat wurde mit der TCA-Fällung verfolgt und erreichte nach ca. 90 min ein Plateau. Die markierte tRNA^{Phe} wurde mit Ethanol gefällt und zur Trennung von mitgefälltem (γ - ^{32}P)ATP nach Zugabe eines 20fachen Überschusses an nicht-markiertem ATP an Sephadex G-25 (1.5x60 cm) chromatographiert.

Die Homogenität der (^{32}P)-markierten tRNA^{Phe} wurde durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von Harnstoff (Philippson, 1971) und anschließender Autoradiographie überprüft. War mehr als 5% der Radioaktivität in tRNA-Fragmente eingebaut, wurde die intakte tRNA mittels präparativer Gelelektrophorese isoliert (Wintermeyer, 1972). Die Aminoacylierbarkeit des markierten Endproduktes lag über $1.5 \text{ nmol Phe/A}_{260}$ -Einheit. Um die Verunreinigung mit tRNA-Molekülen ohne 5'-terminales Phosphat gering zu halten, wurde schließlich mit einem zehnfachen Überschuß unbehandelter tRNA^{Phe} versetzt; die spezifische Radioaktivität lag danach bei ca. 500 cpm/pmol.

5.1.6. Ternärer Komplex $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}} \cdot \text{EF-Tu} \cdot \text{GTP}$

Zur Herstellung des ternären Komplexes wurden $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ und ein zweifacher Überschuß an EF-Tu in Gegenwart eines regenerierenden Systems (6 mM Phosphoenolpyruvat und 10 $\mu\text{g/ml}$ Pyruvatkinase (E.C. 2.7.1.40; Boehringer Mannheim) mit 0.3 mM GTP und 1 mM ATP) 10 min bei 20°C im jeweiligen Reaktionspuffer stehenlassen und anschließend bis zum Verbrauch auf Eis gelagert.

5.1.7. Enzyme

Phenylalanyl-tRNA-Ligase aus E. coli (E.C. 6.1.1.20) wurde partiell angereichert durch Chromatographie an DEAE-Sephrose CL-6B (Pharmacia, Uppsala) und Hydroxylapatit (Bernardi, 1971). Das entsprechende Enzym aus Hefe war zur Homogenität gereinigt (Hirsch & Zachau, 1976) und wurde von U. Pachmann zur Verfügung gestellt.

Der Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) aus *E. coli* MRE 600 wurde nach Leberman et al. (1980) isoliert. Abweichend von dieser Vorschrift wurden die Zellen durch Verreiben mit Alumina (Sigma, München) geöffnet; ferner wurde dem Isolierungspuffer 10 μ M GDP zugegeben. Zur weiteren Reinigung wurde das Protein zweimal kristallisiert (Chinali et al., 1977) und bei 4°C in 25 mM Tris·HCl, pH 7.8, 5 mM MgCl₂, 1 mM Dithioerythrit, 50 μ M GDP, 0.5 mM EDTA und 0.5 mM NaN₃ mit 35% Ammoniumsulfat gelagert. Die Reinheit wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) abgeschätzt und war mindestens 99.5%.

Zur Bestimmung der Aktivität des EF-Tu wurde die A-Stellenbindung des ternären Komplexes Phe-tRNA^{Phe}·EF-Tu·GTP an Poly(U)-programmierte Ribosomen, deren P-Stelle blockiert war (5.2.1.), verfolgt. Dazu wurden steigende Mengen EF-Tu mit 2-3 pmol (¹⁴C)Phe-tRNA^{Phe} wie unter 5.1.6. beschrieben präinkubiert und dann mit 7 pmol Ribosomen (70 μ l Endvolumen) versetzt. Nach 1 min wurde der Ribosomen-gebundene Teil der Phe-tRNA^{Phe} durch Nitrocellulosefiltration isoliert. Die Aktivität des EF-Tu wurde aus der stöchiometrischen Titrationskurve relativ zur Menge an Phe-tRNA^{Phe} abgelesen.

5.1.8. Sonstige Reagentien

Sämtliche Puffersubstanzen wurden von Merck (Darmstadt), Sigma (München) oder Boehringer Mannheim bezogen. Nukleosidphosphate, Polynukleotide und Puromycin stammten von Boehringer Mannheim.

5.2. Methoden

5.2.1. Herstellung der tRNA-Ribosomen-Komplexe

Für die tRNA-Ribosomen-Bindungsversuche wurden folgende Puffer verwendet: A) 50 mM Tris·HCl, pH 7.5, 50 mM KCl, 90 mM NH_4Cl , 1mM Dithioerythrit und 20 oder 10 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$; B) 50 mM Tris·HCl, pH 7.5, 30 mM KCl, 30 mM NH_4Cl , 1mM Dithioerythrit und 15, 10 oder 6 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$; C) 10 mM Tris·HCl, pH 7.5, 35 mM NH_4Cl , 1mM Dithioerythrit und 20 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$. Sofern nicht anders angegeben, war Poly(U) in einer Konzentration von 1 A_{260} -Einheit/ml anwesend, und die Reaktionstemperatur betrug 20°C.

Vor der Herstellung der tRNA-Ribosomen-Komplexe wurden zunächst Ribosomen und Poly(U) für 5 min bei 37°C und Proflavin-markierte tRNA^{Phe} mindestens 30 min bei 20°C im jeweiligen Reaktionspuffer präinkubiert. Zur Bindung der tRNA in die P- und/oder E-Stelle wurde dann mindestens 1 min stehengelassen. Die relativ langsame, nicht-enzymatische Bindung in die A-Stelle machte längere Inkubationszeiten erforderlich: 30, 60, 90 und 120 min bei 20, 15, 10 und 6 mM Mg^{2+} . Die Bindung von Phe-tRNA^{Phe} in Gegenwart von EF-Tu·GTP wurde nach bereits 30 s gemessen.

Während der Untersuchung der A-Stelle in Abwesenheit von EF-Tu wurde die rasche Hydrolyse von Phe-tRNA^{Phe} durch die Verwendung von "in situ" aminoacylierter tRNA^{Phe} vermieden. Dazu wurden tRNA^{Phe} aus Hefe (bis zu 5 μM) bei 37°C mit 1.5 mU/ml Phenylalanyl-tRNA-Ligase aus Hefe, 50 μM (^{14}C)Phenylalanin (504 Ci/Mol) und dem regenerierenden System (s. 5.1.6.) im jeweiligen Reaktionspuffer aminoacyliert. Nachdem der Einbau der Aminosäure nach ca. 30 min ein Plateau erreicht hatte (höher als 1.2 nmol

Phe/A₂₆₀-Einheit), wurde die Reaktionslösung ohne weitere Isolierung verwendet. Um die Blindwerte im Filterbindungstest auf übliche Werte zu senken (s. 5.2.3.), wurde dem Waschpuffer 5 mM Phenylalanin zugegeben.

Die Blockierung der P- bzw. der P- und A-Stelle wurde durch einen 1.1- bzw. 2.3fachen Überschuß an N-AcPhe-trNA^{Phe} (E. coli oder Hefe) oder an trNA^{Phe} (Hefe) bei einer Ribosomenkonzentration von ca. 0.5 µM erreicht. Nach der Äquilibrierung wurde das Reaktionsgemisch mit Puffer auf die jeweilige Experimentkonzentration verdünnt. Die P-Stelle war dadurch zu mehr als 95%, die A-Stelle zu mindestens 85% besetzt. Der durch die unvollständige Blockierung verursachte Fehler bei der Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten war kleiner als 10%.

In Abwesenheit von Poly(U) wurde zur Bindung von N-AcPhe-trNA^{Phe} in die P-Stelle 30 und 60 min bei 20 und 10 mM Mg²⁺ inkubiert, während zur Bindung von deacylierter trNA^{Phe} in die P- und E-Stelle nur 1 min nötig war. Die Blockierung der P-Stelle zur separaten Untersuchung der E-Stelle erfolgte mit einem dreifachen Überschuß an N-AcPhe-trNA^{Phe} und war besser als 85%.

5.2.2. Titrationsverfahren

Sämtliche Titrationen zur Untersuchung der ribosomalen tRNA-Bindungsstellen wurden durch Variation der tRNA-Menge bei konstanter Ribosomenkonzentration durchgeführt. In stöchiometrischen Titrationen (Sättigungstitrationen) lag diese bei 0.2-0.5 µM; für Gleichgewichtstitrationen wurde eine Ribosomenkonzentration im Bereich der Dissoziationskonstanten der untersuchten Bindungsstelle gewählt ($c_R \approx 1/K$).

5.2.3. Analyse der tRNA-Ribosomen-Komplexe

Die Analyse der tRNA-Ribosomen-Komplexe wurde einerseits mit klassischen Methoden (Filterbindungstest und Puromycinreaktion) vorgenommen. Darüberhinaus wurde die Komplexbildung auch mit einem in dieser Arbeit entwickelten Indikatorbindungstest und mit der Fluoreszenzmethode verfolgt.

Der Filterbindungstest zur Bestimmung radioaktiv-markierter, Ribosomen-gebundener tRNA (Nirenberg & Leder, 1964) und der Test der Puromycinreaktivität zur Analyse P-Stellen-gebundener N-AcPhe-tRNA^{Phe} (Maden & Monro, 1968; Leder & Bursztyn, 1968) wurden in leicht abgewandelter Form durchgeführt (Lill, 1981; Robertson & Wintermeyer, 1981). Weitere Modifizierungen werden besonders erwähnt. Die jeweiligen Blindwerte in Abwesenheit von Ribosomen waren kleiner als 2% bzw. 5% (relativ zur gesamten tRNA-Menge) und wurden - außer beim Indikatorbindungstest - abgezogen.

Der Indikatorbindungstest bietet eine weitere Bestimmungsmethode für den Besetzungsgrad der ribosomalen P- und A-Stelle mit tRNA. Dieser wird indirekt durch die spezifische Bindung sog. Indikator-tRNAs in die P- bzw. A-Stelle analysiert. Der Vorteil des Tests besteht darin, daß die zu untersuchenden tRNAs nicht markiert sein müssen. Zunächst wurden Poly(U)-programmierte Ribosomen (0.5 µM) wie unter 5.2.1. beschrieben mit steigenden Mengen tRNA^{Phe} oder N-AcPhe-tRNA^{Phe} (10 Ci/Mol) präinkubiert. Der Indikatortest wurde durch die Zugabe einer konstanten Menge an N-AcPhe-tRNA^{Phe} (P-Stelle) oder ternärem Komplex Phe-tRNA^{Phe}·EF-Tu·GTP (A-Stelle) gestartet. Nach weiterer Inkubation von 15 min bzw. 30 s wurde der P- bzw. A-Stellen-gebundene Teil der Indika-

tor-tRNA durch die Puromycinreaktivität bzw. durch Filtration über Nitrocellulose analysiert. Die Verwendung einer Dosiervorrichtung (PB 600-1; Hamilton, Bonaduz) mit Mikroliterspritze (50 µl, gasdicht, Serie 700; Hamilton, Bonaduz) erlaubte es, die Indikator-tRNA in einem kleinen Volumen (Verdünnung geringer als 10%) mit einem Fehler von weniger als 1% zuzugeben. Relativ zur Ribosomenkonzentration variierte die Menge an Indikator-tRNA von 10-30% bei stöchiometrischen Titrationsen bis zu 35-90% bei Gleichgewichtstitrationen.

In Fluoreszenztitrationsen wurden die Titrationsdaten aus der Differenz der Signale in Anwesenheit ("Komplextitration") und Abwesenheit ("Referenztitration") von Ribosomen bestimmt (Lill, 1981). Um die Streuung der Meßpunkte gering zu halten, wurden anstelle der Originaldaten Referenzdaten abgezogen, die zuvor durch eine lineare Regression der gesamten Referenztitration geglättet worden waren. Bei schneller Bildung der tRNA-Ribosomen-Komplexe, d.h. während der Untersuchung der E-Stelle und bei Titrationsen in Abwesenheit von mRNA, erwies sich eine kontinuierliche Zugabe der fluoreszierenden tRNA mit der oben beschriebenen Dosiervorrichtung als genauere und sparsamere Methode. Wegen der langsamen Bindung in die A-Stelle war für alle anderen Messungen nur eine Einzelpunkttitration geeignet. Bei Proflavin-markierten tRNA-Derivaten erfolgte die Anregung bei 442 nm, die Emission wurde bei 492 nm registriert. Die entsprechenden Werte zur Messung der Fluoreszenz des natürlichen Fluorophors Wybutin in tRNA^{Phe} aus Hefe waren 317 und 425 nm. In diesem Fall wurde zur Vermeidung von Fremdfluoreszenz die Benutzung von Plastikgeschirr vermieden und nur besonders gereinigte Puffersubstanzen sowie quarzdestilliertes Wasser benutzt.

5.2.4. Apparative Hilfsmittel

Das Fluoreszenzspektrometer war ausgerüstet mit einer 450 W Xenonlampe (Osram) und Doppelmonochromatoren für Anregung (Schoeffel GM 252 D) und Emission (Schoeffel GM 200). Die Küvette (Innenmaße 5x5x27 mm, Quarzspezialglas, Hellma) befand sich in einem thermostatisierbaren Meßblock. Die Fluoreszenzintensität wurde senkrecht zur Anregungsrichtung mit einem Photomultiplier (RCA 8850) und einem Zweikanal-Einzelphotonenzählgerät (5CI, Ortec Brookdeal) registriert. Für die spätere Auswertung wurden die Daten direkt zu einem BASIC-Tischrechner (Tektronix 4052) übertragen.

Radioaktivität wurde mit dem Flüssigkeits-Szintillationszähler MR 300 (Kontron, Eching), der mit einem Programm zur dpm-Berechnung ausgerüstet war, gezählt. Für die verwendeten Szintillatormischungen (5g Scintimix I (Koch-Light) in 1l Toluol für Filter; 5g Scintimix I in 1l Toluol:Triton-X100 = 2:1 für flüssige Proben) betrug die Zählausbeute für das Kohlenstoff-Isotop (^{14}C) 92 +- 1%. Absorptionsmessungen wurden mit dem Spektralphotometer PM QII (Zeiss, Oberkochen) vorgenommen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Bestimmung der Zahl der tRNA-Bindungsstellen des E. coli Ribosoms, die qualitative Charakterisierung ihrer Bindungseigenschaften und die Messung ihrer Affinitäten. Dazu wurde die Bindung deacylierter oder aminoacylierter tRNA^{Phe} an Ribosomen aus E. coli untersucht und die Komplexbildung mit Hilfe der Filtrations- und der Fluoreszenztechnik verfolgt. Ziel der Untersuchungen war es, durch die Bestimmung eines konsistenten Datensatzes für die Affinitäten der einzelnen tRNA-Bindungsstellen zu einem thermodynamischen Verständnis des 'Elongationszyklus' der Proteinbiosynthese zu kommen.

Zur Bestimmung der tRNA-Bindungsaktivität der benutzten Ribosomenpräparation, deren Kenntnis natürlich Voraussetzung für alle weiteren Untersuchungen ist, wurde ein Bindungstest entwickelt, der die spezifische Bindung von Indikator-tRNAs in die P- und A-Stelle des Ribosoms ausnutzt. Diese indirekte Methode erlaubt die getrennte Untersuchung beider Bindungsstellen und vermeidet die methodischen Nachteile der bisher verwendeten Tests. Für alle in dieser Arbeit verwendeten tRNA-Arten, d.h. für deacylierte tRNA^{Phe}, Phe-tRNA^{Phe} und N-AcPhe-tRNA^{Phe} (als Analogon einer Peptidyl-tRNA) wurde eine einheitliche Aktivität beider Bindungsstellen von 65% erhalten.

Die auf dieser Grundlage durchgeführten Sättigungstitrationen zeigten, daß in Gegenwart von Poly(U) als mRNA zwei Moleküle N-AcPhe-tRNA^{Phe} pro aktivem Ribosom binden, und zwar in der P- und der A-Stelle. Für deacylierte tRNA existiert eine zusätzliche,

dritte Bindungsstelle, die E-Stelle. Die Eigenschaften der E-Stelle unterscheiden sich deutlich von denen der P- und A-Stelle: Die tRNA-Bindung ist sehr labil und nicht wesentlich beeinflusst von der Konzentration monovalenter Kationen oder von der An- oder Abwesenheit von mRNA.

Für die Auswertung der Bindungskonstanten stellt die Existenz mehrerer tRNA-Bindungsstellen ein erhebliches Problem dar. Um den Gleichgewichtstitrationen trotzdem die Affinitäten der einzelnen Bindungsstellen getrennt ("stellenspezifisch") entnehmen zu können, wurde erstmals die Möglichkeit benutzt, die P- oder die P- und A-Stelle spezifisch mit tRNA zu besetzen ("blockieren"), um danach die noch unbesetzten Bindungsstellen zu titrieren. Die so zuerst bestimmten Bindungskonstanten der schwächeren Bindungsstellen wurden dann bei der Auswertung der Titrationen der stärkeren Bindungsstellen als bekannt benutzt. Grundlage für dieses experimentelle Vorgehen war zum einen die hohe Stabilität dieser Komplexe und zum anderen die sequentielle Besetzung der einzelnen Bindungsstellen.

Für die Affinitäten der P-Stelle wurden, abhängig von der tRNA-Art (deacylierte tRNA^{Phe} oder N-AcPhe-tRNA^{Phe}) und den ionischen Bedingungen, Werte zwischen 10^8 und $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ gefunden. Die Bindungsstärke der A-Stelle ist für alle untersuchten tRNAs und Bedingungen 20-200fach niedriger. Die Aminoacylierung der tRNA^{Phe} führt zu einer Erhöhung der Bindungsstärke um Faktor 4-40, was darauf hindeutet, daß auch die Aminoacyl- bzw. Peptidylgruppe in Wechselwirkung mit dem Ribosom steht. Für die Bindung deacylierter tRNA^{Phe} in die E-Stelle, die wegen der ausgeprägten Labilität des Komplexes ausschließlich mit der Fluoreszenzmethode untersucht wurde, wurden ähnliche Affinitäten wie für die A-

Stelle erhalten. In Abwesenheit von mRNA sinkt die Bindungsstärke der P-Stelle um 2-4 Größenordnungen. Die Affinität der A-Stelle lag niedriger als die unterste Erfassungsgrenze von 10^5 M^{-1} . In klarem Gegensatz dazu wird die Bindung deacylierter tRNA^{Phe} in die E-Stelle nicht wesentlich (maximal vierfach) geschwächt, ein Befund, der die Existenz einer Codon-Anticodon-Wechselwirkung in der E-Stelle, wie für die P- und A-Stelle gefunden, sehr unwahrscheinlich macht.

Die Codon-Unabhängigkeit der tRNA-Bindung in die E-Stelle folgt ebenso aus der Beobachtung, daß auch tRNAs ganz unterschiedlicher Aminosäurespezifität ("falsch-kodierte tRNAs") mit vergleichbaren Affinitäten in die E-Stelle Poly(U)-programmierter Ribosomen binden. Die Unterschiede in der Bindungsstärke der einzelnen tRNAs sind zwar gering (bis zu achtfach), lassen sich aber korrelieren mit dem Grad der Homologie zum Anticodonstamm der tRNA^{Phe} aus E. coli. Möglicherweise nimmt also dieser Bereich des tRNA-Moleküls an der Ribosomenbindung in der E-Stelle teil. Recht wahrscheinlich ist diese Wechselwirkung für das 3'-Ende der tRNA, da die Bindung von tRNA^{Phe} in die E-Stelle durch Aminoacylierung oder durch Abspaltung des 3'-terminalen Adenosins unterdrückt wird. Die molekularen Gründe für diese, funktionell wichtige, Spezifität sind unbekannt.

Aus den hier vorgelegten Daten läßt sich ein Modell für den Translokationsschritt des Elongationszyklus' entwickeln, das im Unterschied zum bisher allgemein akzeptierten Modell der Proteinbiosynthese die E-Stelle als Austrittsstelle für deacylierte tRNA vom Ribosom einbezieht. Es ist bekannt, daß die Verschiebung des tRNA/mRNA-Komplexes um ein Codon auch ohne die Beteiligung des Elongationsfaktors G und GTP ablaufen kann, also ohne weitere

Energiequelle eine exergonische Reaktion ist. Nach den hier ermittelten Bindungskonstanten ist der spontane Ablauf dieser Teilreaktion nur verständlich, wenn die deacylierte tRNA nicht sofort das Ribosom verläßt, sondern zunächst von der P- in die E-Stelle verschoben wird. Unter physiologischen Bedingungen wird nämlich der Verlust an Bindungsenergie der Peptidyl-tRNA in der A-Stelle in etwa aufgewogen durch die Bindung deacylierter tRNA in die E-Stelle; die Triebkraft der Reaktion liegt damit in der, im Vergleich zur deacylierten tRNA, wesentlich stärkeren Bindung der Peptidyl-tRNA in die P-Stelle. Im vollständigen Elongationssystem liegt die funktionelle Bedeutung einer Ribosomen-gebundenen Zwischenstufe weniger im thermodynamischen Gewinn als in der dadurch zu erreichenden höheren Reaktionsgeschwindigkeit des Prozesses. Die Entfernung der deacylierten tRNA vom Ribosom in zwei Schritten wirkt sich, im Vergleich zur Ein-Schritt-Reaktion, in einer beträchtlichen Erniedrigung der Aktivierungsenergie aus. Die resultierende Erhöhung der Proteinsynthesegeschwindigkeit (mehr als 30fach) stellt einen bedeutenden Selektionsvorteil dar und könnte zur Konservierung der E-Stelle beigetragen haben.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Ackers, G.K., Shea, M.A., & Smith, F.R. (1983) J. Mol. Biol. 170, 223 - 242
- Bergemann, K., & Nierhaus, K.H. (1983) J. Biol. Chem. 258, 15105 - 15113
- Bernardi, G. (1971) Methods Enzymol. 21, 95 - 139
- Cantor, C.R. (1979) in Schimmel et al. (1979), S. 363 - 392
- Cantor, C.R., & Schimmel, P.R. (1980) Biophysical Chemistry, Teil III, Freeman and Co., San Francisco
- Chambliss, G., Craven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L., & Nomura, M., Hrsg. (1980) Ribosomes: Structure, Function, and Genetics, University Park Press, Baltimore, MD
- Chetverin, A.B., & Spirin, A.S. (1982) Biochim. Biophys. Acta 683, 153 - 179
- Chinali, G., & Parmeggiani, A. (1980) J. Biol. Chem. 255, 7455 - 7459
- Chinali, G., Wolf, H., & Parmeggiani, A. (1977) Eur. J. Biochem. 75, 55 - 65
- Chládek, S., & Sprinzl, M. (1985) Angew. Chem. 97, 377 - 398
- Crick, F.H.C. (1966) J. Mol. Biol. 19, 548 - 555
- deGroot, N., Panet, A., & Lapidot, Y. (1971) Eur. J. Biochem. 23, 523 - 527
- Eigen, M. (1971) Naturwissenschaften 58, 465 - 523
- Eisinger, J., & Gross, N. (1975) Biochemistry 14, 4031 - 4041
- Fairclough, R.H., & Cantor, C.R. (1979) J. Mol. Biol. 132, 575 - 586
- Fairclough, R.H., Cantor, C.R., Wintermeyer, W., & Zachau, H.G. (1979) J. Mol. Biol. 132, 557 - 573
- Fersht, A.R., Shi, J.-P., Knill-Jones, J., Lowe, D.M., Wilkinson, A.J., Blow, D.M., Brick, P., Carter, P., Waye, M.M.Y., & Winter, G. (1985) Nature 314, 235 - 238
- Frederick, C.A., Grable, J., Melia, M., Samudzi, C., Jen-Jacobson, L., Wang, B.-C., Greene, P., Boyer, H.W., & Rosenberg, J.M. (1984) Nature 309, 327 - 331
- Gassen, H.G. (1982) Angew. Chem. 94, 15 - 27

- Gast, F.-U., Langowski, J., & Pingoud, A. (1985) Anal. Biochem. 147, 364 - 368
- Gauss, D., & Sprinzl, M. (1983) Nucleic Acids Res. 11, r1 - r53
- Gavrilova, L.P., Kostiashekina, O.E., Koteliansky, V.E., Rutkevitch, N.M., & Spirin, A.S. (1976) J. Mol. Biol. 101, 537 - 552
- Gouy, M., & Grantham, R. (1980) FEBS Lett. 115, 151 - 155
- Grajevskaja, R.A., Ivanov, Y.V., & Saminsky, E.M. (1982) Eur. J. Biochem. 128, 47 - 52
- Graybill, F.A. (1969) Introduction to Matrices with Application in Statistics, Wadworth Publishing Co., Belmont, CA
- Grosjean, H.J., DeHenau, S., & Crothers, D.M. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 610 - 614
- Guéron, M., & Leroy, J.L. (1978) Anal. Biochem. 91, 691 - 695
- Haenni, A.L., & Chapeville, F. (1966) Biochim. Biophys. Acta 114, 135 - 148
- Hardesty, B., Culp, W., & McKeehan, W. (1969) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 331 - 345
- Helk, B., & Sprinzl, M. (1985) Nucleic Acids Res. 13, 6283 - 6298
- Hirsch, R., & Zachau, H.G. (1976) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 509 - 526
- Holschuh, K., Riesner, D., & Gassen, H.G. (1981) Nature 293, 675 - 677
- Hopfield, J.J. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4135 - 4139
- Inoue-Yokosawa, N., Ishikawa, C., & Kaziro, Y. (1974) J. Biol. Chem. 249, 4321 - 4323
- Jelenc, P.C. (1980) Anal. Biochem. 105, 369 - 374
- Johnson, A.E., Adkins, H.J., Matthews, E.A., & Cantor, C.R. (1982) J. Mol. Biol. 156, 113 - 140
- Kim, S.H., Suddath, F.L., Quigley, G.J., McPherson, A., Sussman, J.L., Wang, A.H.J., Seeman, N.J., & Rich, A. (1974) Science (Washington, D.C.) 185, 435 - 440
- Kirillov, S.V., Kemkhadze, K.S., Makarov, E.M., Makhno, V.I., Odinzov, V.B., & Semenov, Y.P. (1980) FEBS Lett. 120, 221 - 224
- Kirillov, S.V., Makarov, E.M., & Semenov, Y.P. (1983) FEBS Lett. 157, 91 - 94
- Kirillov, S.V., Makhno, V.I., Odinzov, V.B., & Semenov, Y.P. (1978) Eur. J. Biochem. 89, 305 - 313

- Kirillov, S.V., & Odinzov, V.B. (1978) *Nucleic Acids Res.* 5, 1501 - 1514
- Kirillov, S.V., & Semenov, Y.P. (1982) *FEBS Lett.* 148, 235 - 238
- Klotz, I.M. (1974) *Accts. Chem. Res.* 7, 162 - 168
- Klotz, I.M. (1983) *Trends Pharmacol. Sci.* 4, 253 - 255
- Klotz, I.M., & Hunston, D.L. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 3001 - 3009
- Klotz, I.M., & Hunston, D.L. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 193, 314 - 328
- Kurland, C.G., & Ehrenberg, M. (1984) *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* 31, 191 - 219
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* 227, 680 - 685
- Lake, J.A. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 1903 - 1907
- Lake, J.A. (1979) in Schimmel et al. (1979), S. 393 - 411
- Lake, J.A. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* 54, 507 - 530
- Leberman, R., Antonsson, B., Giovanelli, R., Guariguata, R., Schumann, R., & Wittinghofer, A. (1980) *Anal. Biochem.* 104, 29 - 36
- Leder, P. (1973) *Adv. Protein Chem.* 27, 213 - 242
- Leder, P., Bernardi, A., Livingston, D., Loyd, B., Roufa, D.J., & Skogerson, L.E. (1969) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34, 411 - 417
- Leder, P., & Bursztyn, H. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25, 233 - 238
- Lessard, J.L., & Pestka, S. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6901 - 6908 und 6909 - 6912
- Lill, R. (1981) *Diplomarbeit, Universität München*
- Lipmann, F. (1969) *Science (Washington, D.C.)* 164, 1024 - 1031
- Louie, A., & Jurnak, F. (1985) *Biochemistry* 24, 6433 - 6439
- Lührmann, R., Eckhardt, H., & Stöffler, G. (1979) *Nature* 280, 423 - 425
- Maden, B.E.H., & Monro, R.E. (1968) *Eur. J. Biochem.* 6, 309 - 316
- Modolell, J., Girbés, T., & Vázquez, D. (1975) *FEBS Lett.* 60, 109 - 113
- Moore, P.B. (1980) in Chambliss et al. (1980), S. 111 - 133

- Munson, P.J. (1983) *Methods Enzymol.* 92, 543 - 576
- Nierhaus, K.H. (1982) *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 97, 81 - 155
- Nierhaus, K.H. (1984) *Mol. Cell. Biochem.* 61, 63 - 81 und *Trends Biochem. Sci.* 9, 428 - 432
- Nierhaus, K.H., & Rheinberger, H.-J. (1984) *Trends Biochem. Sci.* 9, 428 - 432
- Ninio, J. (1975) *Biochimie* 57, 587 - 595
- Nirenberg, M., & Leder, P. (1964) *Science (Washington, D.C.)* 145, 1399 - 1407
- Noll, H. (1966) *Science (Washington, D.C.)* 151, 1241 - 1245
- Noll, M., Hapke, B., Schreiner, M.H., & Noll, H. (1973) *J. Mol. Biol.* 75, 281 - 294
- Odinzov, V.B., & Kirillov, S.V. (1978) *Nucleic Acids Res.* 5, 3871 - 3879
- Ofengand, J. (1980) in Chambliss et al. (1980), S. 497 - 529
- Pachmann, U., & Zachau, H.G. (1978) *Nucleic Acids Res.* 5, 961 - 973
- Paulsen, H., Robertson, J.M., & Wintermeyer, W. (1982) *Nucleic Acids Res.* 10, 2651 - 2663
- Paulsen, H., Robertson, J.M., & Wintermeyer, W. (1983) *J. Mol. Biol.* 167, 411 - 426
- Paulsen, H., & Wintermeyer, W. (1984) *Eur. J. Biochem.* 138, 117 - 123 und 125 - 130
- Paulsen, H., & Wintermeyer, W. (1986) *Biochemistry*, im Druck
- Pesce, A.J., Rosén, C.G., & Pasby, T.L. (1971) *Fluorescence Spectroscopy*, Kap. 7, Marcel Dekker, New York
- Pestka, S. (1969) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34, 395 - 410
- Pestka, S. (1971) *Ann. Rev. Microbiol.* 25, 487 - 562
- Pestka, S. (1977) in Weissbach & Pestka (1977), S. 467 - 553
- Peters, M., & Yarus, M. (1979) *J. Mol. Biol.* 134, 471 - 491
- Philippsen, P. (1971) *Dissertation*, Universität München
- Pingoud, A., & Urbanke, C. (1980) *Biochemistry* 19, 2108 - 2112

- Prince, J.B., & Garrett, R.A. (1982) Trends Biochem. Sci. 7, 79 und 280
- Prince, J.B., Gutell, R.R., & Garrett, R.A. (1983) Trends Biochem. Sci. 8, 359 - 363
- Rappoport, S., & Lapidot, Y. (1974) Methods Enzymol. 29, 685 - 688
- Record, M.T.Jr., Lohman, T.M., & deHaseth, P.L. (1976) J. Mol. Biol. 107, 145 - 158
- Record, M.T.Jr., Anderson, C.F., & Lohman, T.M. (1978) Q. Rev. Biophys. 11, 103 - 178
- Rheinberger, H.-J., & Nierhaus, K.H. (1980) Biochem. Int. 1, 297 - 303
- Rheinberger, H.-J., & Nierhaus, K.H. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 4213 - 4217
- Rheinberger, H.-J., Schilling, S., & Nierhaus, K.H. (1983) Eur. J. Biochem. 134, 421 - 428
- Rheinberger, H.-J., Sternbach, H., & Nierhaus, K.H. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 5310 - 5314
- Richardson, C.C. (1969) Ann. Rev. Biochem. 38, 795 - 840
- Richardson, C.C. (1981) in The Enzymes XIV, Part A (Boyer, P.D., Hrsg.), S. 299 - 314, Academic Press, New York
- Robertson, J.M., Kahan, M., Wintermeyer, W., & Zachau, H.G. (1977) Eur. J. Biochem. 72, 117 - 125
- Robertson, J.M., Lill, R., & Wintermeyer, W. (1984) in Metabolism and Enzymology of Nucleic Acids Including Gene Manipulations 5 (Zelinka, J., & Balan, J., Hrsg.) S. 307 - 319, Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava
- Robertson, J.M., Urbanke, C., Chinali, G., Wintermeyer, W., & Parmeggiani, A. (1986) J. Mol. Biol., im Druck
- Robertson, J.M., & Wintermeyer, W. (1981) J. Mol. Biol. 151, 57 - 79
- Roufa, D.J., Skogerson, L.E., & Leder, P. (1970) Nature 227, 567 - 570
- Scatchard, G. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660 - 672
- Schimmel, P.R., Söll, D. & Abelson, J.N., Hrsg. (1979) Transfer RNA: Structure, Function, and Recognition, Cold Spring Harbor Laboratory
- Schmitt, M., Möller, A., Riesner, D., & Gassen, H.G. (1981) Eur. J. Biochem. 119, 61 - 66

- Schmitt, M., Neugebauer, U., Bergmann, C., Gassen, H.G., & Riesner, D. (1982) *Eur. J. Biochem.* 127, 525 - 529
- Spirin, A.S. (1969) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34, 197 - 207
- Spirin, A.S. (1978) *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* 21, 39 - 62
- Stöffler, G., & Stöffler-Meilicke, M. (1984) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 13, 303 - 330
- Stryer, L. (1981) *Biochemistry*, Kap. 11, Freeman and Co., San Francisco
- Swan, D., Sander, G., Bermek, E., Krämer, W., Kreuzer, T., Arglebe, C., Zöllner, R., Eckert, K., & Matthaei, H. (1969) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34, 179 - 196
- Thiebe, R. (1982) *Eur. J. Biochem.* 126, 77 - 81
- Thiebe, R. (1983) *Eur. J. Biochem.* 130, 517 - 524
- Thompson, R.C., & Karim, A.M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 4922 - 4926
- Traut, R.R., Lambert, J.M., Boileau, G., & Kenny, J.W. (1980) in Chambliss et al. (1980), S. 89 - 110
- van Holde, K.E., & Hill W.E. (1974) in *Ribosomes* (Nomura, M., Tissières, A., & Lengyel, P., Hrsg.), S. 53 - 91, Cold Spring Harbor, New York
- Walseth, T.F., & Johnson, R.A. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 562, 11 - 31
- Watanabe, S. (1972) *J. Mol. Biol.* 67, 443 - 457
- Watson, J.D. (1964) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 46, 1399 - 1425
- Weissbach, H., & Pestka, S., Hrsg. (1977) *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis*, Academic Press, New York
- Wettstein, F.O., & Noll, H. (1965) *J. Mol. Biol.* 11, 35 - 53
- Winkler-Oswatitsch, R., & Eigen, M. (1979) *Angew. Chem.* 91, 20 - 51
- Wintermeyer, W. (1972) *Dissertation*, Universität München
- Wintermeyer, W., Lill, R., Paulsen, H. & Robertson, J.M. (1985a) in *Mechanisms of Protein Synthesis* (Bermek, E., Hrsg.), S. 76 - 89, Springer, Berlin Heidelberg
- Wintermeyer, W., Lill, R., Paulsen, H. & Robertson, J.M. (1985b) in *Structure, Function, and Genetics of Ribosomes*, (Hardesty, B., Hrsg.), Springer, New York, im Druck

- Wintermeyer, W., & Robertson, J.M. (1982) *Biochemistry* 21, 2246 - 2252
- Wintermeyer, W., & Zachau, H.G. (1975) *FEBS Lett.* 58, 306 - 309
- Wintermeyer, W., & Zachau, H.G. (1979) *Eur. J. Biochem.* 98, 465 - 475
- Wittmann, H.G. (1982) *Ann. Rev. Biochem.* 51, 155 - 183
- Wittmann, H.G. (1983) *Ann. Rev. Biochem.* 52, 35 - 65
- Wittmann, H.G., Müssig, J., Piefke, J., Gewitz, H.S., Rheinberger, H.-J., & Yonath, A. (1982) *FEBS Lett.* 146, 217 - 220
- Woese, C.R. (1970) *Nature* 226, 817 - 820
- Wool, I.G. (1979) *Ann. Rev. Biochem.* 48, 719 - 754
- Wrede, P., Woo, N.H., & Rich, A. (1979a) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 3289 - 3293
- Wrede, P., Wurst, R., Vournakis, J., & Rich, A. (1979b) *J. Biol. Chem.* 254, 9608 - 9616
- Wurmbach, P., & Nierhaus, K.H. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 2143 - 2147
- Yonath, A., Bartunik, H.D., Bartels, K.S., & Wittmann, H.G. (1984) *J. Mol. Biol.* 177, 201 - 206

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
A-Stelle	Aminoacyl-tRNA-Bindungsstelle des Ribosoms
A_{260}	Extinktion bei 260 nm und 1 cm Lichtweg
C_M^+	Konzentration des Ions M^+
cpm	Impulse pro Minute
dpm	Zerfälle pro Minute
EF-G	Elongationsfaktor G
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu
E-Stelle	Dritte tRNA-Bindungsstelle des Ribosoms (sog. "exit site")
Gl.	Gleichung
K	Gleichgewichtskonstante der Assoziation
mRNA	Boten-RNA ("messenger"-RNA)
N-AcPhe-tRNA ^{Phe}	N-Acetyl-phenylalanyl-tRNA ^{Phe}
Poly(U)	Poly-Uridylsäure
Prf	Proflavin
P-Stelle	Peptidyl-tRNA-Bindungsstelle des Ribosoms
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
Tris·HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
tRNA ^{Phe} _{Prf16/17}	Phenylalanin-spezifische tRNA aus Hefe mit Proflavin in Basenposition 16 und/oder 17
tRNA ^{Phe} _{Prf16/20}	Phenylalanin-spezifische tRNA aus E. coli mit Proflavin in Basenposition 16 und/oder 20

Alle weiteren Abkürzungen entsprechen den Empfehlungen der IUPAC-IUB, (1977) Eur. J. Biochem. 74, 1-6.



Lebenslauf

Am 9.10.1955 wurde ich als einziges Kind des damaligen Müllermeisters Rolf Lill und seiner Frau Ilse in Öhringen/Württ. geboren. Durch die berufliche Veränderung meines Vaters zum kaufmännischen Angestellten wechselte meine Familie mehrmals den Wohnort. Von 1962 bis 1966 besuchte ich die Grundschule in Salem und Ditzingen und trat danach in das Albert-Schweitzer-Gymnasium in Leonberg ein. 1974 legte ich am Gymnasium in Plochingen/Neckar die Reifeprüfung ab. Nach dem Grundwehrdienst studierte ich an der Universität Ulm Chemie bis zum Vordiplom; das Hauptstudium an der Universität München schloß ich im März 1981 mit der Diplomarbeit "Versuche zur Wechselwirkung von tRNA und Ribosomen" am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie unter der Anleitung von Prof. Dr. W. Wintermeyer ab. Seit September 1981 arbeite ich an der vorliegenden Dissertation.

